

Europäisches  
Patentamt

European Patent  
Office

PCT/EP200 4 / 0 0 8 6 2 3

Office européen  
des brevets

20. 11. 2004

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

REC'D 0 2 DEC. 2004	
WIPO	PCT



### Bescheinigung

### Certificate

### Attestation

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten internationalen Patentanmeldung überein.

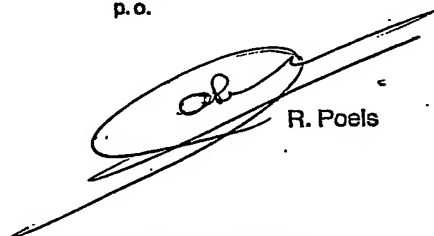
The attached documents are exact copies of the international patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet international spécifiée à la page suivante.

Den Haag, den  
The Hague,  
La Haye, le

01. 09. 2004

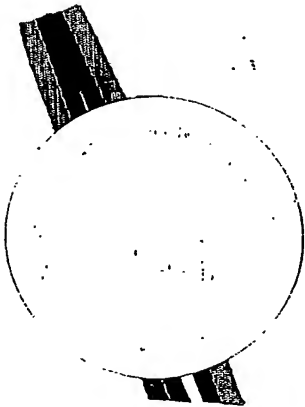
Der Präsident des Europäischen Patentamts  
Im Auftrag  
For the President of the European Patent Office  
Le Président de l'Office européen des brevets  
p.o.



R. Poels

Patentanmeldung Nr.  
Patent application no.  
Demande de brevet n°

PCT/EP 03/09102



Blatt 2 der Bescheinigung  
Sheet 2 of the certificate  
Page 2 de l'attestation



Anmeldung Nr.:  
Application no.:  
Demande n°:

PCT/EP 03/09102

Anmelder:  
Applicant(s):  
Demandeur(s):

1. SUNGENE GMBH & CO. KGAA - Gatersleben, Deutschland
2. SCHOPFER, Christel Renate - Quedlinburg, Deutschland (nur US)
3. FLACHMAN, Ralf - Quedlinburg, Deutschland (nur US)

Bezeichnung der Erfindung:

Title of the invention:  
Titre de l'invention:

Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden in Blütenblättern von Pflazen

Anmeldetag:  
Date of filing:  
Date de dépôt:

18. August 2003 (18.08.2003)

In Anspruch genommene Priorität(en)  
Priority(ies) claimed  
Priorité(s) revendiquée(s)

Staat:  
State:  
Pays:

Deutschland

Tag:  
Date:  
Date: 13. November 2002  
(13.11.2002)

Aktenzeichen:  
File no. 10253112.9  
Numéro de dépôt:

Benennung von Vertragsstaaten : Siehe Formblatt PCT/RO/101 (beigefügt)  
Designation of contracting states : See Form PCT/RO/101 (enclosed)  
Désignation d'états contractants : Voir Formulaire PCT/RO/101 (ci-joint)

Bemerkungen:  
Remarks:  
Remarques:

Weitere Anmelder:

4. HERBERS, Karin - Quedlinburg, Deutschland (nur US)
5. KUNZE, Irene - Gatersleben, Deutschland (nur US)
6. SAUER, Matt - Quedlinburg, Deutschland (nur US)
7. KLEBSATTEL, Martin - Quedlinburg, Deutschland (nur US)

Weitere Prioritätsansprüche:

Deutschland

16. Dezember 2002  
(16.12.2002)

10258971.2



**Weitere Prioritätsansprüche:**

Deutschland	20. August 2002 (20.08.2002)	10238980.2
Deutschland	20. August 2002 (20.08.2002)	10238978.0
Deutschland	20. August 2002 (20.08.2002)	10238979.9

## PCT-ANTRAG

Original (für EINREICHUNG) - gedruckt am 06.08.2003 11:38:58 AM

0000053862

IV-1	Anwalt oder gemeinsamer Vertreter; oder besondere Zustellanschrift Die unten bezeichnete Person ist/wird hiermit bestellt, um den (die) Anmelder vor den internationalen Behörden zu vertreten, und zwar als:	Anwalt
IV-1-1	Name (FAMILIENNAME, Vorname)	DÖRPER, Thomas
IV-1-2	Anschrift:	c/o BASF Aktiengesellschaft  D-67056 Ludwigshafen Deutschland
IV-1-3	Telefonnr.	0621/60-94182
IV-1-4	Telefaxnr.	0621/60-52538
V	Bestimmung von Staaten	
V-1	Regionales Patent (andere Schutzrechtsarten oder Verfahren sind ggf. in Klammern nach der (den) betreffenden Bestimmung(en) angegeben)	AP: GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZM ZW und jeder weitere Staat, der Mitgliedstaat des Harare-Protokolls und Vertragsstaat des PCT ist EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM und jeder weitere Staat, der Mitgliedsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und Vertragsstaat des PCT ist EP: AT BE BG CH&LI CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LU MC NL PT RO SE SI SK TR und jeder weitere Staat, der Mitgliedsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und Vertragsstaat des PCT ist OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ GW ML MR NE SN TD TG und jeder weitere Staat, der Mitgliedstaat der OAPI und Vertragsstaat des PCT ist
V-2	Nationales Patent (andere Schutzrechtsarten oder Verfahren sind ggf. in Klammern nach der (den) betreffenden Bestimmung(en) angegeben)	AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH&LI CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NI NO NZ OM PG PH PL PT RO RU SC SD SE SG SK SL SY TJ TM TN TR TT TZ UA UG US UZ VC VN YU ZA ZM ZW

# Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden in Blütenblättern von Pflanzen

## 5 Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern aufweisen, die genetisch veränderten Pflanzen, sowie deren Verwendung als Nahrungs- und Futtermittel und zur Herstellung von Ketocarotinoidextrakten.

Carotinoide werden de novo in Bakterien, Algen, Pilzen und Pflanzen synthetisiert. Ketocarotinoide, also Carotinoide, die mindestens eine Keto-Gruppe enthalten, wie beispielsweise Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin und Adonixanthin sind natürliche Antioxidantien und Pigmente, die von einigen Algen und Mikroorganismen als Sekundärmetabolite produziert werden.

Aufgrund ihrer farbgebenden Eigenschaften werden die Ketocarotinoide und insbesondere Astaxanthin als Pigmentierhilfsstoffe in der Tierernährung, insbesondere in der Forellen-, Lachs- und Shrimpszucht verwendet.

Die Herstellung von Astaxanthin erfolgt heutzutage größtenteils durch chemische Syntheseverfahren. Natürliche Ketocarotinoide, wie beispielsweise natürliches Astaxanthin, werden heutzutage in biotechnologischen Verfahren in kleinen Mengen durch Kultivierung von Algen, beispielsweise *Haematococcus pluvialis* oder durch Fermentation von gentechnologisch optimierten Mikroorganismen und anschließender Isolierung gewonnen.

Ein wirtschaftliches biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von natürlichen Ketocarotinoiden ist daher von großer Bedeutung.

Aus WO 00/32788 ist es bekannt, durch kombinierte Überexpression von Carotinoid-Biosynthesegenen und Antisense-Verfahren bestimmte Carotinoidverhältnisse in Tagetespetalen zu beeinflussen.

WO 98/18910 beschreibt die Synthese von Ketocarotinoiden in Nektarien von Tabakblüten durch Einbringen eines Ketolase-Gens in Tabak.

WO 01/20011 beschreibt ein DNA Konstrukt zur Produktion von Ketocarotinoiden, insbesondere Astaxanthin, in Samen von Ölsaatpflanzen wie Raps, Sonnenblume, Sojabohne und Senf unter Verwendung eines Samen-spezifischen Promotors und einer Ketolase  
5 aus Haematococcus.

Die in WO 98/18910 und WO 01/20011 offenbarten Verfahren liefern zwar genetisch veränderte Pflanzen, die in spezifischen Geweben einen Gehalt an Ketocarotinoiden aufweisen, weisen jedoch den  
10 Nachteil auf, dass die Höhe des Gehalts an Ketocarotinoiden und die Reinheit, insbesondere an Astaxanthin noch nicht zufriedenstellend ist.

Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, ein alternatives  
15 Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von Pflanzen zur Verfügung zu stellen, bzw. weitere transgene Pflanzen, die Ketocarotinoide herstellen, zur Verfügung zu stellen, die optimierte Eigenschaften, wie beispielsweise einen höheren Gehalt an Ketocarotinoiden aufweisen und den geschilderten  
20 Nachteil des Standes der Technik nicht aufweisen.

Demgemäß wurde ein Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden gefunden, indem man genetisch veränderte Pflanzen kultiviert, die im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Ketolase-Aktivität in  
25 Blütenblättern aufweisen.

Bis auf wenige Ausnahmen abgesehen, wie beispielsweise das Adonisröschen, enthalten Pflanzen und insbesondere die Blütenblätter, die auch Petalen genannt werden, zwar Carotinoide, aber  
30 keine Ketocarotinoide. In der Regel weisen daher die Blütenblätter von Wildtyppflanzen keine Ketolase-Aktivität auf.

In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden daher als Ausgangspflanzen Pflanzen verwendet, die bereits als  
35 Wildtyp in Blütenblättern eine Ketolaseaktivität aufweisen, wie beispielsweise das Adonisröschen. In dieser Ausführungsform bewirkt die genetische Veränderung eine Erhöhung der Ketolase-Aktivität in Blütenblättern.

40 Unter Ketolase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Ketolase verstanden.

Unter einer Ketolase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, am, gegebenenfalls substituierten,  
45  $\beta$ -Ionon-Ring von Carotinoiden eine Keto-Gruppe einzuführen.

Insbesondere wird unter einer Ketolase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist,  $\beta$ -Carotin in Canthaxanthin umzuwandeln.

- 5 Dementsprechend wird unter Ketolase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Ketolase umgesetzte Menge  $\beta$ -Carotin bzw. gebildete Menge Canthaxanthin verstanden.

- Bei einer erhöhten Ketolase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird  
10 somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Ketolase die umgesetzte Menge  $\beta$ -Carotin bzw. die gebildete Menge Canthaxanthin erhöht.

- Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Ketolase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt  
15 mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Ketolase-Aktivität des Wildtyps.

- 20 Unter dem Begriff "Wildtyp" wird erfindungsgemäß die entsprechende nicht genetisch veränderte Ausgangspflanze verstanden.

- Je nach Zusammenhang kann unter dem Begriff "Pflanze" die Ausgangspflanze (Wildtyp) oder eine erfindungsgemäße, genetisch ver-  
25 änderte Pflanze oder beides verstanden werden.

- Vorzugsweise und insbesondere in Fällen, in denen die Pflanze oder der Wildtyp nicht eindeutig zugeordnet werden kann, wird unter "Wildtyp" für die Erhöhung oder Verursachung der Ketolase-  
30 Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-  
35 Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase-Aktivität, für die nachstehend  
40 beschriebene Erhöhung der Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der Phytoen-Synthase-Aktivität,  
45 für die nachstehend beschriebene Erhöhung der Phytoen-Desaturase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene

Erhöhung der crtISO-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der FtsZ-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der MinD-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität und für die nachstehend  
5 beschriebene Reduzierung der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase Aktivität und die Erhöhung des Gehalts an Ketocarotinoiden jeweils eine Referenzpflanze verstanden.

Diese Referenzpflanze ist für Pflanzen, die bereits als Wildtyp  
10 eine Ketolase-Aktivität in Blütenblätter aufweisen vorzugsweise *Adonis aestivalis*, *Adonis flammeus* oder *Adonis annuus*, besonders bevorzugt *Adonis aestivalis*.

Diese Referenzpflanze ist für Pflanzen, die als Wildtyp keine Ketolase-Aktivität in Blütenblätter aufweisen, vorzugsweise *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Tagetes lucida*, *Tagetes pringlei*, *Tagetes palmeri*, *Tagetes minuta* oder *Tagetes campanulata*, besonders bevorzugt *Tagetes erecta*.

20 Die Bestimmung der Ketolase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

Die Bestimmung der Ketolase-Aktivität in Pflanzenmaterial erfolgt  
25 in Anlehnung an die Methode von Frazer et al., (J. Biol. Chem. 272(10): 6128-6135, 1997). Die Ketolase-Aktivität in pflanzlichen Extrakten wird mit den Substraten beta-Carotin und Canthaxanthin in Gegenwart von Lipid (Sojalecithin) und Detergens (Natriumcho-  
lat) bestimmt. Substrat/Produkt-Verhältnisse aus den Ketolase-  
30 Assays werden mittels HPLC ermittelt.

Die Erhöhung der Ketolase-Aktivität kann durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Translations- und Proteinebene oder  
35 durch Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Ketolase gegenüber dem Wildtyp, beispielsweise durch Induzierung des Ketolase-Gens durch Aktivatoren oder durch Einbringen von Nukleinsäuren kodierend eine Ketolase in die Pflanze.

40 Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Ketolase wird erfindungsgemäß in dieser Ausführungsform auch die Manipulation der Expression der Pflanzen eigenen endogenen Ketolasen verstanden. Dies kann beispielsweise durch Veränderung der Promotor DNA-Sequenz für Ketolase kodierende Gene erreicht  
45 werden. Eine solche Veränderung, die eine veränderte oder vorzugsweise erhöhte Expressionsrate mindestens eines endogenen

Ketolase Gens zur Folge hat, kann durch Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen erfolgen.

Es ist wie vorstehend beschrieben möglich, die Expression mindestens einer endogenen Ketolase durch die Applikation exogener Stimuli zu verändern. Dies kann durch besondere physiologische Bedingungen, also durch die Applikation von Fremdstoffen erfolgen.

Des Weiteren kann eine erhöhte Expression mindestens eines endogenen Ketolase-Gens dadurch erzielt werden, dass ein in der Wildtyppflanze nicht vorkommendes oder modifiziertes Regulatorprotein mit dem Promotor dieser Gene in Wechselwirkung tritt.

Solch ein Regulator kann ein chimäres Protein darstellen, welches aus einer DNA-Bindedomäne und einer Transkriptionsaktivator-Domäne besteht, wie beispielsweise in WO 96/06166 beschrieben.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Ketolase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Ketolase durch Einbringen von Nukleinsäuren, die Ketolasen kodieren, in die Pflanze.

In den erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen liegt also in dieser Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres Ketolase-Gen vor. In dieser Ausführungsform weist die erfindungsgemäße genetisch veränderte Pflanze dementsprechend mindestens eine exogene (=heterologe) Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, auf oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, auf

In einer anderen, bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden als Ausgangspflanzen Pflanzen verwendet, die als Wildtyp in Blütenblättern keine Ketolaseaktivität aufweisen, wie beispielsweise *Tomate*, *Marigold*, *Tagetes erecta*, *Tagetes lucida*, *Tagetes minuta*, *Tagetes pringlei*, *Tagetes palmeri* und *Tagetes campanulata*.

In dieser, bevorzugten Ausführungsform verursacht die genetische Veränderung die Ketolase-Aktivität in Blütenblättern. Die erfindungsgemäße genetisch veränderte Pflanze weist somit in dieser, bevorzugten Ausführungsform im Vergleich zum genetisch nicht veränderten Wildtyp eine Ketolase-Aktivität in Blüten-

blättern auf und ist somit vorzugsweise in der Lage, in Blütenblättern transgen eine Ketolase zu exprimieren.

In dieser bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Verursachung  
5 der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Ketolase analog zu der vorstehend beschriebenen Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Ketolase vorzugsweise durch Einbringen von Nukleinsäuren, die Ketolasen kodieren in die Ausgangspflanze.

10

Dazu kann in beiden Ausführungsformen prinzipiell jedes Ketolase-Gen, also jede Nukleinsäuren die eine Ketolase kodiert verwendet werden.

15 Alle in der Beschreibung erwähnten Nukleinsäuren können beispielsweise eine RNA-, DNA- oder cDNA-Sequenz sein.

Bei genomischen Ketolase-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall, dass die Wirtspflanze  
20 nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden Ketolase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

25 Beispiele für Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase und die entsprechenden Ketolasen, die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können sind beispielsweise Sequenzen aus

Haematoccus pluvialis, insbesondere aus Haematoccus pluvialis  
30 Flotow em. Wille (Accession NO: X86782; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 1, Protein SEQ ID NO: 2),

Haematoccus pluvialis, NIES-144 (Accession NO: D45881; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 3, Protein SEQ ID NO: 4),

35

Agrobacterium aurantiacum (Accession NO: D58420; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 5, Protein SEQ ID NO: 6),

Alicalicoccus spec. (Accession NO: D58422; Nukleinsäure:  
40 SEQ ID NO: 7, Protein SEQ ID NO: 8),

Paracoccus marcusii (Accession NO: Y15112; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 9, Protein SEQ ID NO: 10).

45 Synechocystis sp. Strain PC6803 (Accession NO: NP442491; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 11, Protein SEQ ID NO: 12).



Bradyrhizobium sp. (Accession NO: AF218415; Nukleinsäure:  
SEQ ID NO: 13, Protein SEQ ID NO: 14).

Nostoc sp. Strain PCC7120 (Accession NO: AP003592, BAB74888;  
5 Nukleinsäure: SEQ ID NO: 15, Protein SEQ ID NO: 16).

Haematococcus pluvialis  
(Accession NO: AF534876, AAN03484; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 81,  
Protein : SEQ ID NO: 82)

10

Paracoccus sp. MBIC1143  
(Accession NO: D58420, P54972; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 83,  
Protein : SEQ ID NO: 84)

15 Brevundimonas aurantiaca  
(Accession NO: AY166610, AAN86030; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 85,  
Protein : SEQ ID NO: 86)

Nodularia spumigena NSOR10  
20 (Accession NO: AY210783, AAO64399; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 87,  
Protein : SEQ ID NO: 88)

Nostoc punctiforme ATCC 29133  
(Accession NO: NZ\_AABC01000195, ZP\_00111258; Nukleinsäure: SEQ ID  
25 NO: 89, Protein : SEQ ID NO: 90)

Nostoc punctiforme ATCC 29133  
(Accession NO: NZ\_AABC01000196; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 91,  
Protein : SEQ ID NO: 92)

30

Deinococcus radiodurans R1  
(Accession NO: E75561, AE001872; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 93,  
Protein : SEQ ID NO: 94)

35 Weitere natürliche Beispiele für Ketolasen und Ketolase-Gene,  
die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können,  
lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren  
genomische Sequenz bekannt ist, durch Identitätsvergleiche der  
Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten

40 Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit den vorstehend  
beschriebenen Sequenzen und insbesondere mit den Sequenzen  
SEQ ID NO: 2 und/oder 16 und/oder 90 und/oder 92 leicht auf-  
finden.

45 Weitere natürliche Beispiele für Ketolasen und Ketolase-Gene  
lassen sich weiterhin ausgehend von den vorstehend beschriebenen  
Nukleinsäuresequenzen, insbesondere ausgehend von den Sequenzen

SEQ ID NO: 2 und/oder 16 und/oder 90 und/oder 92 aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungstechniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

5

Die Hybridisierung kann unter moderaten (geringe Stringenz) oder vorzugsweise unter stringenten (hohe Stringenz) Bedingungen erfolgen.

- 10 Solche Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise bei Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., in: Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57 oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 be-
- 15 geschrieben.

- Beispielhaft können die Bedingungen während des Waschschrilles ausgewählt sein aus dem Bereich von Bedingungen begrenzt von solchen mit geringer Stringenz (mit 2X SSC bei 50°C) und solchen mit
- 20 hoher Stringenz (mit 0.2X SSC bei 50°C, bevorzugt bei 65°C) (20X SSC: 0,3 M Natriumcitrat, 3 M Natriumchlorid, pH 7.0).

- Darüberhinaus kann die Temperatur während des Waschschrilles von moderaten Bedingungen bei Raumtemperatur, 22°C, bis zu stringenten
- 25 Bedingungen bei 65°C angehoben werden.

- Beide Parameter, Salzkonzentration und Temperatur, können gleichzeitig variiert werden, auch kann einer der beiden Parameter konstant gehalten und nur der andere variiert werden. Während der
- 30 Hybridisierung können auch denaturierende Agenzien wie zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegenwart von 50 % Formamid wird die Hybridisierung bevorzugt bei 42°C ausgeführt.

- Einige beispielhafte Bedingungen für Hybridisierung und Waschs-
- 35 schritt sind infolge gegeben:

(1) Hybridisierungsbedingungen mit zum Beispiel

- (i) 4X SSC bei 65°C, oder
- 40 (ii) 6X SSC bei 45°C, oder
- (iii) 6X SSC bei 68°C, 100 mg/ml denaturierter Fischsperma-DNA, oder

45

## 9

- (iv) 6X SSC, 0.5 % SDS, 100 mg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA bei 68°C, oder
- (v) 6XSSC, 0.5 % SDS, 100 mg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA, 50 % Formamid bei 42°C, oder
- (vi) 50 % Formamid, 4X SSC bei 42°C, oder
- (vii) 50 % (vol/vol) Formamid, 0.1 % Rinderserumalbumin, 0.1 % Ficoll, 0.1 % Polyvinylpyrrolidon, 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 6.5, 750 mM NaCl, 75 mM Natriumcitrat bei 42°C, oder
- (viii) 2X oder 4X SSC bei 50°C (moderate Bedingungen), oder
- (ix) 30 bis 40 % Formamid, 2X oder 4X SSC bei 42° (moderate Bedingungen).

(2) Waschschritte für jeweils 10 Minuten mit zum Beispiel

- (i) 0.015 M NaCl/0.0015 M Natriumcitrat/0.1 % SDS bei 50°C, oder
- (ii) 0.1X SSC bei 65°C, oder
- (iii) 0.1X SSC, 0.5 % SDS bei 68°C, oder
- (iv) 0.1X SSC, 0.5 % SDS, 50 % Formamid bei 42°C, oder
- (v) 0.2X SSC, 0.1 % SDS bei 42°C, oder
- (vi) 2X SSC bei 65°C (moderate Bedingungen).

In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren bringt man Nukleinsäuren ein, die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 %, vorzugsweise mindestens 30 %, bevorzugter mindestens 40 %, bevorzugter mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 60 %, bevorzugter mindestens 70 %, bevorzugter mindestens 80 %, besonders bevorzugt mindestens 90 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase aufweist.

Dabei kann es sich um eine natürliche Ketolase-Sequenz handeln, die wie vorstehend beschrieben durch Identitätsvergleich der

## 10

Sequenzen aus anderen Organismen gefunden werden kann oder um eine künstliche Ketolase-Sequenz die ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 2 durch künstliche Variation, beispielsweise durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgewandelt wurde.

In einer weiteren, bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren bringt man Nukleinsäuren ein die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 16 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 %, vorzugsweise mindestens 30 %, bevorzugter mindestens 40 %, bevorzugter mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 60 %, bevorzugter mindestens 70 %, bevorzugter mindestens 80 %, besonders bevorzugt mindestens 90 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 16 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase aufweist.

Dabei kann es sich um eine natürliche Ketolase-Sequenz handeln, die, wie vorstehend beschrieben, durch Identitätsvergleich der Sequenzen aus anderen Organismen gefunden werden kann oder um eine künstliche Ketolase-Sequenz die ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 16 durch künstliche Variation, beispielsweise durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgewandelt wurde.

In einer weiteren, bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren bringt man Nukleinsäuren ein die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 90 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 %, vorzugsweise mindestens 30 %, bevorzugter mindestens 40 %, bevorzugter mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 60 %, bevorzugter mindestens 70 %, bevorzugter mindestens 80 %, besonders bevorzugt mindestens 90 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 90 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase aufweist.

Dabei kann es sich um eine natürliche Ketolase-Sequenz handeln, die, wie vorstehend beschrieben, durch Identitätsvergleich der Sequenzen aus anderen Organismen gefunden werden kann oder um eine künstliche Ketolase-Sequenz die ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 90 durch künstliche Variation, beispielsweise durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgewandelt wurde.

## 11

In einer weiteren, bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren bringt man Nukleinsäuren ein die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 92 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 %, vorzugsweise mindestens 30 %, bevorzugter mindestens 40 %, bevorzugter mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 60 %, bevorzugter mindestens 70 %, bevorzugter mindestens 80 %, besonders bevorzugt mindestens 90 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 92 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase aufweist.

Dabei kann es sich um eine natürliche Ketolase-Sequenz handeln, die, wie vorstehend beschrieben, durch Identitätsvergleich der Sequenzen aus anderen Organismen gefunden werden kann oder um eine künstliche Ketolase-Sequenz die ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 92 durch künstliche Variation, beispielsweise durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgewandelt wurde.

20

Unter dem Begriff "Substitution" ist in der Beschreibung der Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren durch eine oder mehrere Aminosäuren zu verstehen. Bevorzugt werden sog. konservative Austausche durchgeführt, bei denen die ersetzte Aminosäure eine ähnliche Eigenschaft hat wie die ursprüngliche Aminosäure, beispielsweise Austausch von Glu durch Asp, Gln durch Asn, Val durch Ile, Leu durch Ile, Ser durch Thr.

Deletion ist das Ersetzen einer Aminosäure durch eine direkte Bindung. Bevorzugte Positionen für Deletionen sind die Termini des Polypeptides und die Verknüpfungen zwischen den einzelnen Proteindomänen.

Insertionen sind Einfügungen von Aminosäuren in die Polypeptidkette, wobei formal eine direkte Bindung durch ein oder mehrere Aminosäuren ersetzt wird.

Unter Identität zwischen zwei Proteinen wird die Identität der Aminosäuren über die jeweils gesamte Proteinelänge verstanden, insbesondere die Identität die durch Vergleich mit Hilfe der Lasergene Software der Firma DNASTAR, inc. Madison, Wisconsin (USA) unter Anwendung der Clustal Methode (Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a micro-computer. Comput Appl. Biosci. 1989 Apr;5(2):151-1) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

## 12

Multiple alignment parameter:

Gap penalty 10

Gap length penalty 10

Pairwise alignment parameter:

5 K-tuple 1

Gap penalty 3

Window 5

Diagonals saved 5

- 10 Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit einer bestimmten Sequenz aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der bestimmten Sequenz insbesondere nach obigem Programmlogarithmus mit obigem Parametersatz eine Identität
- 15 von mindestens 20 % aufweist.

Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder 16 oder 90 oder 92 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden,

- 20 das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder 16 oder 90 oder 92, insbesondere nach obigem Programmlogarithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 20 % aufweist.

- 25 Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

- Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend
- 30 der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

- In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine
- 35 Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 1 in die Pflanze ein.

- In einer weiteren, besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 15 in
- 40 die Pflanze ein.

In einer weiteren, besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 89 in die Pflanze ein.

13

In einer weiteren, besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 91 in die Pflanze ein.

- 5 Alle vorstehend erwähnten Ketolase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann  
 10 beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, S. 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden  
 15 in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet man genetisch veränderte Pflanzen,  
 20 die in Blüten die höchste Expressionsrate einer Ketolase aufweisen.

Vorzugsweise wird dies dadurch erreicht, das die Genexpression der Ketolase unter Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors  
 25 erfolgt. Beispielsweise werden dazu die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, wie nachstehend ausführlich beschrieben, in einem Nukleinsäurekonstrukt, funktionell verknüpft mit einem blütenspezifischen Promotor in die Pflanze eingebracht.

- 30 Unter Pflanzen werden erfindungsgemäß vorzugsweise Pflanzen verstanden, die als Wildtyp in Blütenblättern Chromoplasten aufweisen. Weiter bevorzugte Pflanzen weisen als Wildtyp in den Blütenblättern zusätzlich Carotinoide, insbesondere  $\beta$ -Carotin, Zeaxanthin, Neoxanthin, Violaxanthin oder Lutein auf. Weiter bevorzugte Pflanzen weisen als Wildtyp in den Blütenblättern zusätzlich eine Hydroxylase-Aktivität auf.

Unter Hydroxylase -Aktivität wird die Enzymaktivität einer Hydroxylase verstanden.

40

Unter einer Hydroxylase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, am, gegebenenfalls substituierten,  $\beta$ -Ionon-Ring von Carotinoiden eine Hydroxy-Gruppe einzuführen.

45

## 14

Insbesondere wird unter einer Hydroxylase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist,  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin oder Cantaxanthin in Astaxanthin umzuwandeln.

5 Dementsprechend wird unter Hydroxylase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxylase umgesetzte Menge  $\beta$ -Carotin oder Cantaxanthin bzw. gebildete Menge Zeaxanthin oder Astaxanthin verstanden.

- 10 Besonders bevorzugte Pflanzen sind Pflanzen ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, 15 Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Illiaceae oder Lamiaceae.

Ganz besonders bevorzugte Pflanzen sind ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzengattungen Marigold, *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*,

- 20 *Acacia*, *Aconitum*, *Adonis*, *Arnica*, *Aquilegia*, *Aster*, *Astragalus*, *Bignonia*, *Calendula*, *Caltha*, *Campanula*, *Canna*, *Centaurea*, *Cheiranthus*, *Chrysanthemum*, *Citrus*, *Crepis*, *Crocus*, *Curcubita*, *Cytisus*, *Delonia*, *Delphinium*, *Dianthus*, *Dimorphotheca*, *Doronicum*, *Eschscholtzia*, *Forsythia*, *Fremontia*, *Gazania*, *Gelsemium*, *Genista*, 25 *Gentiana*, *Geranium*, *Gerbera*, *Geum*, *Grevillea*, *Helenium*, *Helianthus*, *Hepatica*, *Heracleum*, *Hisbiscus*, *Heliopsis*, *Hypericum*, *Hypochoeris*, *Impatiens*, *Iris*, *Jacaranda*, *Kerria*, *Laburnum*, *Lathyrus*, *Leontodon*, *Lilium*, *Linum*, *Lotus*, *Lycopersicon*, *Lysimachia*, *Maratia*, *Medicago*, *Mimulus*, *Narcissus*, *Oenothera*, *Osmanthus*, *Petunia*, 30 *Photinia*, *Physalis*, *Phyteuma*, *Potentilla*, *Pyracantha*, *Ranunculus*, *Rhododendron*, *Rosa*, *Rudbeckia*, *Senecio*, *Silene*, *Silphium*, *Sinapsis*, *Sorbus*, *Spartium*, *Tecoma*, *Torenia*, *Tragopogon*, *Trollius*, *Tropaeolum*, *Tulipa*, *Tussilago*, *Ulex*, *Viola* oder *Zinnia*, besonders bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzengattungen Mari- 35 gold, *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Lycopersicon*, *Rosa*, *Calendula*, *Physalis*, *Medicago*, *Helianthus*, *Chrysanthemum*, *Aster*, *Tulipa*, *Narcissus*, *Petunia*, *Geranium*, *Tropaeolum* oder *Adonis*.

- In einer bevorzugten Ausführungsform werden Pflanzen kultiviert, 40 die gegenüber dem Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und/oder  $\beta$ -Cyclase-Aktivität aufweisen.

Unter Hydroxylase-Aktivität die Enzymaktivität einer Hydroxylase verstanden.



## 15

Unter einer Hydroxylase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, am, gegebenenfalls substituierten,  $\beta$ -Ionon-Ring von Carotinoiden eine Hydroxy-Gruppe einzuführen. .

- 5 Insbesondere wird unter einer Hydroxylase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist,  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin oder Cantaxanthin in Astaxanthin umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Hydroxyase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxylase umgesetzte Menge  $\beta$ -Carotin oder Cantaxanthin bzw. gebildete Menge Zeaxanthin oder Astaxanthin verstanden.

- 15 Bei einer erhöhten Hydroxylase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxylase die umgesetzte Menge  $\beta$ -Carotin oder Cantaxanthin bzw. die gebildete Menge Zeaxanthin oder Astaxanthin erhöht.

- 20 Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Hydroxylase-Aktivität des Wild-
- 25 typs.

Unter der nachstehend beschriebenen "endogenen  $\beta$ -Hydroxylase" wird die pflanzeigene, endogene Hydroxylase verstanden. Die Bestimmung der Aktivität erfolgt analog.

30

Unter  $\beta$ -Cyclase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer  $\beta$ -Cyclase verstanden.

- 35 Unter einer  $\beta$ -Cyclase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, einen endständigen, linearen Rest von Lycopin in einen  $\beta$ -Ionon-Ring zu überführen.

- Insbesondere wird unter einer  $\beta$ -Cyclase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist,  $\gamma$ -Carotin in  $\beta$ -Carotin
- 40 umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter  $\beta$ -Cyclase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein  $\beta$ -Cyclase umgesetzte Menge  $\gamma$ -Carotin bzw. gebildete Menge  $\beta$ -Carotin verstanden.

45

## 16

Bei einer erhöhten  $\beta$ -Cyclase -Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein  $\beta$ -Cyclase die umgesetzte Menge  $\gamma$ -Carotin bzw. die gebildete Menge  $\beta$ -Carotin erhöht.

- 5 Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere  
10 mindestens 600 % der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität des Wildtyps.

Die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

- 15 Die Aktivität der Hydroxylase wird nach Bouvier et al. (Biochim. Biophys. Acta 1391 (1998), 320-328) *in vitro* bestimmt. Es wird zu einer bestimmten Menge an Pflanzenextrakt Ferredoxin, Ferredoxin-NADP Oxidoreductase, Katalase, NADPH sowie beta-Carotin mit Mono-  
20 und Digalaktosylglyzeriden zugegeben.

- Besonders bevorzugt erfolgt die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität unter folgenden Bedingungen nach Bouvier, Keller, d'Harlingue und Camara (Xanthophyll biosynthesis: molecular and  
25 functional characterization of carotenoid hydroxylases from pepper fruits (Capsicum annuum L.; Biochim. Biophys. Acta 1391 (1998), 320-328):

- Der *in-vitro* Assay wird in einem Volumen von 0.250 ml Volumen  
30 durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), 0.025 mg Ferredoxin von Spinat, 0.5 Einheiten Ferredoxin-NADP+ Oxidoreduktase von Spinat, 0.25 mM NADPH, 0.010 mg beta-Carotin (in 0.1 mg Tween 80 emulgiert), 0.05 mM einer Mischung von Mono- und Digalaktosylglyzeriden (1:1), 1 Einheit Katalase, 200 Mono-  
35 und Digalaktosylglyzeriden, (1:1), 0.2 mg Rinderserumalbumin und Pflanzenextrakt in unterschiedlichem Volumen. Die Reaktionsmischung wird 2 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Reaktionsprodukte werden mit organischem Lösungsmittel wie Aceton oder Chloroform/Methanol (2:1) extrahiert und mittels HPLC bestimmt.

- 40 Die Bestimmung der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

- 45 Die Aktivität der  $\beta$ -Cyclase wird nach Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15) *in vitro* bestimmt. Es werden zu einer bestimmten Menge an Pflanzenextrakt

Kaliumphosphat als Puffer (pH 7.6), Lycopin als Substrat, Stroma-protein von Paprika, NADP<sup>+</sup>, NADPH und ATP zugegeben.

- Besonders bevorzugt erfolgt die Bestimmung der Hydroxylase-  
 5 Aktivität unter folgenden Bedingungen nach Bouvier, d'Harlingue und Camara (Molecular Analysis of carotenoid cyclase inhibition; Arch. Biochem. Biophys. 346(1) (1997) 53-64):

- Der in-vitro Assay wird in einem Volumen von 250  $\mu$ l Volumen  
 10 durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), unterschiedliche Mengen an Pflanzenextrakt, 20 nM Lycopin, 250  $\mu$ g an chromoplastidärem Stroma-protein aus Paprika, 0.2 mM NADP<sup>+</sup>, 0.2 mM NADPH und 1 mM ATP. NADP/NADPH und ATP werden in 10  $\mu$ l Ethanol mit 1 mg Tween 80 unmittelbar vor der  
 15 Zugabe zum Inkubationsmedium gelöst. Nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten bei 30°C wird die Reaktion durch Zugabe von Chloroform/Methanol (2:1) beendet. Die in Chloroform extrahierten Reaktionsprodukte werden mittels HPLC analysiert.
- 20 Ein alternativer Assay mit radioaktivem Substrat ist beschrieben in Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15).

- Die Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität und/oder  $\beta$ -Cyclase-  
 25 Aktivität kann durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Expressions- und Proteinebene oder durch Erhöhung der Genexpression von Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxylase und/oder von Nukleinsäuren kodierend eine  $\beta$ -Cyclase gegenüber dem Wildtyp.

- 30 Die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxylase und/oder die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäure kodierend eine  $\beta$ -Cyclase gegenüber dem Wildtyp kann ebenfalls durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch  
 35 Induzierung des Hydroxylase-Gens und/oder  $\beta$ -Cyclase-Gens durch Aktivatoren oder durch Einbringen von einer oder mehrerer Hydroxylase-Genkopien und/oder  $\beta$ -Cyclase-Genkopien, also durch Einbringen mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Hydroxylase und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine  $\epsilon$ -Cyclase in die  
 40 Pflanze.

- Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Hydroxylase und/oder  $\beta$ -Cyclase wird erfindungsgemäß auch  
 45 die Manipulation der Expression der Pflanzen eigenen, endogenen Hydroxylase und/oder  $\beta$ -Cyclase verstanden.

Bei bestimmten Pflanzen, bei denen der Schwerpunkt der Biosynthese auf dem  $\alpha$ -Carotinoid-Weg liegt, wie beispielsweise Pflanzen der Gattung *Tagetes*, ist es vorteilhaft, die endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität zu reduzieren und die Aktivität von  
5 exogenen Hydroxylasen zu erhöhen.

Dies kann beispielsweise durch Veränderung der Promotor DNA-Sequenz für Hydroxylasen und/oder  $\beta$ -Cyclasen kodierende Gene erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine erhöhte Expressionsrate des Gens zur Folge hat, kann beispielsweise durch Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen erfolgen.  
10

Es ist, wie vorstehend beschrieben, möglich, die Expression der endogenen Hydroxylase und/oder  $\beta$ -Cyclase durch die Applikation exogener Stimuli zu verändern. Dies kann durch besondere physiologische Bedingungen, also durch die Applikation von Fremdstoffen erfolgen.  
15

Des weiteren kann eine veränderte bzw. erhöhte Expression eines endogenen Hydroxylase- und/oder  $\beta$ -Cyclase-Gens dadurch erzielt werden, dass ein in der nicht transformierten Pflanze nicht vorkommendes Regulator-Protein mit dem Promotor dieses Gens in Wechselwirkung tritt.  
20

Solch ein Regulator kann ein chimäres Protein darstellen, welches aus einer DNA-Bindedomäne und einer Transkriptionsaktivator-Domäne besteht, wie beispielsweise in WO 96/06166 beschrieben.  
25

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Hydroxylase und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine  $\beta$ -Cyclase durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Hydroxylase und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine  $\beta$ -Cyclase in die Pflanze.  
30

Dazu kann prinzipiell jedes Hydroxylase-Gen bzw. jedes  $\beta$ -Cyclase-Gen, also jede Nukleinsäure, die eine Hydroxylase und jede Nukleinsäure, die eine  $\beta$ -Cyclase kodiert, verwendet werden.  
35

Bei genomischen Hydroxylase-bzw.  $\beta$ -Cyclase-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall das die Wirtspflanze nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechende Hydroxylase bzw.  $\beta$ -Cyclase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.  
40  
45

## 19

Beispiele für ein Hydroxylase-Gene sind:

eine Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase aus *Haematococcus pluvialis*, Accession AX038729, WO 0061764); (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 17, Protein: SEQ ID NO: 18),

5

sowie Hydroxylasen der folgenden Accession Nummern:

|emb|CAB55626.1, CAA70427.1, CAA70888.1, CAB55625.1, AF499108\_1, AF315289\_1, AF296158\_1, AAC49443.1, NP\_194300.1, NP\_200070.1,  
 10 AAG10430.1, CAC06712.1, AAM88619.1, CAC95130.1, AAL80006.1, AF162276\_1, AAO53295.1, AAN85601.1, CRTZ\_ERWHE, CRTZ\_PANAN, BAB79605.1, CRTZ\_ALCSP, CRTZ\_AGRAU, CAB56060.1, ZP\_00094836.1, AAC44852.1, BAC77670.1, NP\_745389.1, NP\_344225.1, NP\_849490.1, ZP\_00087019.1, NP\_503072.1, NP\_852012.1, NP\_115929.1,  
 15 ZP\_00013255.1

Eine besonders bevorzugte Hydroxylase ist weiterhin die Hydroxylase aus Tomate (Accession Y14809) (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 97; Protein: SEQ ID NO: 98).

20 Beispiele für ein  $\beta$ -Cyclase-Gene sind:

eine Nukleinsäure, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase aus Tomate (Accession X86452). (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 19, Protein: SEQ ID NO: 20),

Sowie  $\beta$ -Cyclasen der folgenden Accession Nummern:

25

S66350 lycopene beta-cyclase (EC 5.5.1.-) - tomato  
 CAA60119 lycopene synthase [*Capsicum annuum*]  
 S66349 lycopene beta-cyclase (EC 5.5.1.-) - common tobacco  
 CAA57386 lycopene cyclase [*Nicotiana tabacum*]  
 30 AAM21152 lycopene beta-cyclase [*Citrus sinensis*]  
 AAD38049 lycopene cyclase [*Citrus x paradisi*]  
 AAN86060 lycopene cyclase [*Citrus unshiu*]  
 AAF44700 lycopene beta-cyclase [*Citrus sinensis*]  
 AAK07430 lycopene beta-cyclase [*Adonis palaestina*]  
 35 AAG10429 beta cyclase [*Tagetes erecta*]  
 AAA81880 lycopene cyclase  
 AAB53337 Lycopene beta cyclase  
 AAL92175 beta-lycopene cyclase [*Sandersonia aurantiaca*]  
 CAA67331 lycopene cyclase [*Narcissus pseudonarcissus*]  
 40 AAM45381 beta cyclase [*Tagetes erecta*]  
 AAO18661 lycopene beta-cyclase [*Zea mays*]  
 AAG21133 chromoplast-specific lycopene beta-cyclase [*Lycopersicon esculentum*]  
 AAF18989 lycopene beta-cyclase [*Daucus carota*]  
 45 ZP\_001140 hypothetical protein [*Prochlorococcus marinus* str. MIT9313]

## 20

- ZP\_001050 hypothetical protein [Prochlorococcus marinus subsp. pastoris str. CCMP1378]  
 ZP\_001046 hypothetical protein [Prochlorococcus marinus subsp. pastoris str. CCMP1378]  
 5 ZP\_001134 hypothetical protein [Prochlorococcus marinus str. MIT9313]  
 ZP\_001150 hypothetical protein [Synechococcus sp. WH 8102]  
 AAF10377 lycopene cyclase [Deinococcus radiodurans]  
 BAA29250 393aa long hypothetical protein [Pyrococcus horikoshii]  
 10 BAC77673 lycopene beta-monocyclase [marine bacterium P99-3]  
 AAL01999 lycopene cyclase [Xanthobacter sp. Py2]  
 ZP\_000190 hypothetical protein [Chloroflexus aurantiacus]  
 ZP\_000941 hypothetical protein [Novosphingobium aromaticivorans]  
 AAF78200 lycopene cyclase [Bradyrhizobium sp. ORS278]  
 15 BAB79602 crtY [Pantoea agglomerans pv. milletiae]  
 CAA64855 lycopene cyclase [Streptomyces griseus]  
 AAA21262 dycopene cyclase [Pantoea agglomerans]  
 C37802 crtY protein - Erwinia uredovora  
 BAB79602 crtY [Pantoea agglomerans pv. milletiae]  
 20 AAA64980 lycopene cyclase [Pantoea agglomerans]  
 AAC44851 lycopene cyclase  
 BAA09593 Lycopene cyclase [Paracoccus sp. MBIC1143]  
 ZP\_000941 hypothetical protein [Novosphingobium aromaticivorans]  
 CAB56061 lycopene beta-cyclase [Paracoccus marcusii]  
 25 BAA20275 lycopene cyclase [Erythrobacter longus]  
 ZP\_000570 hypothetical protein [Thermobifida fusca]  
 ZP\_000190 hypothetical protein [Chloroflexus aurantiacus]  
 AAK07430 lycopene beta-cyclase [Adonis palaestina]  
 CAA67331 lycopene cyclase [Narcissus pseudonarcissus]  
 30 AAB53337 Lycopene beta cyclase  
 BAC77673 lycopene beta-monocyclase [marine bacterium P99-3]

Eine besonders bevorzugte b-Cyclase ist weiterhin die chromoplastenspezifische b-Cyclase aus Tomate (AAG21133) (Nukleinsäure:

35 SEQ ID No. 95; Protein: SEQ ID No. 96)

In den erfindungsgemäßen bevorzugten transgenen Pflanzen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres Hydroxylase-Gen und/oder  $\beta$ -Cyclase-Gen

40 vor.

In dieser bevorzugten Ausführungsform weist die genetisch veränderte Pflanze beispielsweise mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase oder mindestens zwei endo-

45 gene Nukleinsäuren, kodierend eine Hydroxylase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase oder

mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase auf.

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als Hydroxylase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 18 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 18, und die die enzymatische Eigenschaft einer Hydroxylase aufweisen.

15 Weitere Beispiele für Hydroxylasen und Hydroxylase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der  
20 Seq ID NO: 18 leicht auffinden.

Weitere Beispiele für Hydroxylasen und Hydroxylase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 17 aus verschiedenen Organismen deren genomische  
25 Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur  
30 Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Hydroxylase der Sequenz SEQ ID NO: 18.

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rück-  
35 übersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die  
40 codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 17 in den Orga-  
45 nismus ein.

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als  $\beta$ -Cyclase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 20 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion  
5 von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 20, und die die enzymatische Eigenschaft einer  $\beta$ -Cyclase auf-  
10 weisen.

Weitere Beispiele für  $\beta$ -Cyclasen und  $\beta$ -Cyclase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben durch Homologiever-  
15 gleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der SEQ ID NO: 20 leicht auffinden.

Weitere Beispiele für  $\beta$ -Cyclasen und  $\beta$ -Cyclase-Gene lassen sich  
20 weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 19 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

25 In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der  $\beta$ -Cyclase der Sequenz SEQ ID NO: 20.

30 Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend  
35 der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine  
40 Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 19 in den Organismus ein.

Alle vorstehend erwähnten Hydroxylase-Gene oder  $\beta$ -Cyclase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Syn-  
45 these aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Syn-



these von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe  
 5 des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

10 In einer weiter bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens weisen die Pflanzen gegenüber dem Wildtyp zusätzlich eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität auf.

Unter  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer  $\epsilon$ -Cyclase  
 15 verstanden.

Unter einer  $\epsilon$ -Cyclase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, einen endständigen, linearen Rest von Lycopin in einen  $\epsilon$ -Ionon-Ring zu überführen.

20

Unter einer  $\epsilon$ -Cyclase wird daher insbesondere ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Lycopin in  $\delta$ -Carotin umzuwandeln.

25 Dementsprechend wird unter  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein  $\epsilon$ -Cyclase umgesetzte Menge Lycopin bzw. gebildete Menge  $\delta$ -Carotin verstanden.

Bei einer reduzierten  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp  
 30 wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein  $\epsilon$ -Cyclase die umgesetzte Menge Lycopin bzw. die gebildete Menge  $\delta$ -Carotin reduziert.

Unter einer reduzierten  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität wird vorzugsweise  
 35 die teilweise oder im wesentlichen vollständige, auf unterschiedliche zellbiologische Mechanismen beruhende Unterbindung oder Blockierung der Funktionalität einer  $\epsilon$ -Cyclase in einer pflanzlichen Zelle, Pflanze oder einem davon abgeleiteten Teil, Gewebe, Organ, Zellen oder Samen verstanden.

40

Die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität in Pflanzen gegenüber dem Wildtyp kann beispielsweise durch Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Proteinmenge, oder der  $\epsilon$ -Cyclase-mRNA-Menge in der Pflanze erfolgen. Dementsprechend kann eine gegenüber dem Wildtyp reduzierte  $\epsilon$ -Cy-  
 45 clase-Aktivität direkt bestimmt werden oder über die Bestimmung

der  $\epsilon$ -Cyclase-Proteinmenge oder der  $\epsilon$ -Cyclase-mRNA-Menge der erfindungsgemäßen Pflanze im Vergleich zum Wildtyp erfolgen.

Eine Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität umfasst eine mengenmäßige Verringerung einer  $\epsilon$ -Cyclase bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen der  $\epsilon$ -Cyclase (d.h. fehlende Nachweisbarkeit von  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität oder fehlende immunologische Nachweisbarkeit der  $\epsilon$ -Cyclase). Vorzugsweise wird die  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität (bzw. die  $\epsilon$ -Cyclase-Proteinmenge oder die  $\epsilon$ -Cyclase-mRNA-Menge) in der Pflanze, besonders bevorzugt in Blüten im Vergleich zum Wildtyp um mindestens 5 %, weiter bevorzugt um mindestens 20 %, weiter bevorzugt um mindestens 50 %, weiter bevorzugt um 100 % reduziert. Insbesondere meint "Reduzierung" auch das vollständige Fehlen der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität (bzw. des  $\epsilon$ -Cyclase-Proteins oder der  $\epsilon$ -Cyclase-mRNA).

Die Bestimmung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

Die  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität kann nach Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15) *in vitro* bestimmt werden, wenn zu einer bestimmten Menge an Pflanzenextrakt Kaliumphosphat als Puffer (pH 7.6), Lycopin als Substrat, Stromaprotein von Paprika, NADP<sup>+</sup>, NADPH und ATP zugegeben werden.

Die Bestimmung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt besonders bevorzugt nach Bouvier, d'Harlingue und Camara (Molecular Analysis of carotenoid cyclase inhibition; Arch. Biochem. Biophys. 346(1) (1997) 53-64):

Der *in-vitro* Assay wird in einem Volumen von 0.25 ml durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), unterschiedliche Mengen an Pflanzenextrakt, 20 nM Lycopin, 0.25 mg an chromoplastidärem Stromaprotein aus Paprika, 0.2 mM NADP<sup>+</sup>, 0.2 mM NADPH und 1 mM ATP. NADP/NADPH und ATP werden in 0.01 ml Ethanol mit 1 mg Tween 80 unmittelbar vor der Zugabe zum Inkubationsmedium gelöst. Nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten bei 30°C wird die Reaktion durch Zugabe von Chloroform/Methanol (2:1) beendet. Die in Chloroform extrahierten Reaktionsprodukte werden mittels HPLC analysiert.

Ein alternativer Assay mit radioaktivem Substrat ist beschrieben in Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15). Eine weitere analytische Methode ist beschrieben in Beyer, Kröncke und Nievelstein (On the mechanism of the lycopene

isomerase/cyclase reaction in *Narcissus pseudonarcissus* L. chromatophore; J. Biol. Chem. 266(26) (1991) 17072-17078).

Vorzugsweise erfolgt die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität in 5 Pflanzen durch mindestens eines der nachfolgenden Verfahren:

- 10 a) Einbringen mindestens einer doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz, nachstehend auch  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA genannt, oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten. Umfasst sind solche Verfahren, bei denen die  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA gegen ein  $\epsilon$ -Cyclase-Gen (also genomische DNA-Sequenzen wie die Promotorsequenz) oder ein  $\epsilon$ -Cyclase-Transkript (also mRNA-Sequenzen) gerichtet ist,
- 15 b) Einbringen mindestens einer  $\epsilon$ -Cyclase antisense-Ribonukleinsäuresequenz, nachstehend auch  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA genannt, oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette. Umfasst sind solche Verfahren, bei denen die  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA gegen ein  $\epsilon$ -Cyclase-Gen (also 20 genomische DNA-Sequenzen) oder ein  $\epsilon$ -Cyclase-Gentranskript (also RNA-Sequenzen) gerichtet ist. Umfasst sind auch  $\alpha$ -anomere Nukleinsäuresequenzen,
- 25 c) Einbringen mindestens einer  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA kombiniert mit einem Ribozym oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 30 d) Einbringen mindestens einer  $\epsilon$ -Cyclase sense-Ribonukleinsäuresequenz, nachstehend auch  $\epsilon$ -Cyclase-senseRNA genannt, zur Induktion einer Kosuppression oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 35 e) Einbringen mindestens eines DNA- oder Protein-bindenden Faktors gegen ein  $\epsilon$ -Cyclase-Gen, -RNA oder -Protein oder einer dessen Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 40 f) Einbringen mindestens einer den  $\epsilon$ -Cyclase RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 45 g) Einbringen mindestens eines Konstruktes zur Erzeugung eines Funktionsverlustes, wie beispielsweise die Generierung von Stopp-Kodons oder eine Verschiebungen im Leseraster, an einem  $\epsilon$ -Cyclase-Gen beispielsweise durch Erzeugung einer Insertion, Deletion, Inversion oder Mutation in einem  $\epsilon$ -Cyclase-Gen. Bevorzugt können Knockout-Mutanten mittels gezielter Insertion in besagtes  $\epsilon$ -Cyclase-Gen durch homologe

Rekombination oder Einbringen von sequenzspezifischen Nukleasen gegen  $\epsilon$ -Cyclase-Gensequenzen generiert werden.

Dem Fachmann ist bekannt, dass auch weitere Verfahren im Rahmen  
5 der vorliegenden Erfindung zur Verminderung einer  $\epsilon$ -Cyclase bzw. seiner Aktivität oder Funktion eingesetzt werden können. Beispielsweise kann auch das Einbringen einer dominant-negativen Variante einer  $\epsilon$ -Cyclase oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette vorteilhaft sein. Dabei kann jedes  
10 einzelne dieser Verfahren eine Verminderung der Proteinmenge, mRNA-Menge und/oder Aktivität einer  $\epsilon$ -Cyclase bewirken. Auch eine kombinierte Anwendung ist denkbar. Weitere Methoden sind dem Fachmann bekannt und können die Behinderung oder Unterbindung der Prozessierung der  $\epsilon$ -Cyclase, des Transports der  $\epsilon$ -Cyclase oder  
15 dessen mRNA, Hemmung der Ribosomenanlagerung, Hemmung des RNA-Spleißens, Induktion eines  $\epsilon$ -Cyclase-RNA abbauenden Enzyms und/oder Hemmung der Translationselongation oder -termination umfassen.

20 Die einzelnen bevorzugten Verfahren seien infolge durch beispielhafte Ausführungsformen beschrieben:

a) Einbringen einer doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenz ( $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA)

25

Das Verfahren der Genregulation mittels doppelsträngiger RNA ("double-stranded RNA interference"; dsRNAi) ist bekannt und beispielsweise in Matzke MA et al. (2000) Plant Mol Biol 43:401-415; Fire A. et al (1998) Nature 391:806-811; WO 99/32619;  
30 WO 99/53050; WO 00/68374; WO 00/44914; WO 00/44895; WO 00/49035 oder WO 00/63364 beschrieben. Auf die in den angegebenen Zitaten beschriebenen Verfahren und Methoden wird hiermit ausdrücklich Bezug genommen.

35 Unter "Doppelsträngiger Ribonukleinsäuresequenz" wird erfindungsgemäß eine oder mehr Ribonukleinsäuresequenzen, die aufgrund komplementärer Sequenzen theoretisch, beispielsweise gemäß den Basenpaarregeln von Watson und Crick und/oder faktisch, beispielsweise aufgrund von Hybridisierungsexperimenten, in vitro  
40 und/oder in vivo in der Lage sind, doppelsträngige RNA-Strukturen auszubilden.

Dem Fachmann ist bewusst, dass die Ausbildung von doppelsträngigen RNA-Strukturen, einen Gleichgewichtszustand darstellt.  
45 Bevorzugt ist das Verhältnis von doppelsträngigen Molekülen zu

27

entsprechenden dissoziierten Formen mindestens 1 zu 10, bevorzugt 1:1, besonders bevorzugt 5:1, am meisten bevorzugt 10:1.

Unter einer doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenz  
5 oder auch  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA wird vorzugsweise ein RNA-Molekül  
verstanden, das einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist  
und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

10 a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-  
Transkripts identisch ist und/oder

b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-  
Promotor-Sequenz identisch ist.

15 Im erfindungsgemäßen Verfahren bringt man daher zur Reduzierung  
der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität bevorzugt in die Pflanze eine RNA ein, die  
einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem  
Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

20 a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-  
Transkripts identisch ist und/oder

b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-  
Promotor-Sequenz identisch ist.

25 Unter dem Begriff " $\epsilon$ -Cyclase-Transkript" wird der transkripierte  
Teil eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens verstanden, der neben der  $\epsilon$ -Cyclase ko-  
dierenden Sequenz beispielsweise auch nichtkodierende Sequenzen,  
wie beispielsweise auch UTRs enthält.

30 Unter einer RNA, die "mit mindestens einem Teil der Pflanze eige-  
nen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist", ist vorzugsweise  
gemeint, dass die RNA-Sequenz mit mindestens einem Teil des theo-  
retischen Transkriptes der  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-Sequenz, also der  
entsprechenden RNA-Sequenz, identisch ist.

35 Unter "einem Teil" des Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Transkripts bzw.  
der Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-Sequenz werden Teil-  
sequenzen verstanden, die von wenigen Basenpaaren bis hin zu  
vollständigen Sequenzen des Transkripts bzw. der Promotorsequenz  
40 reichen können. Die optimale Länger der Teilsequenzen kann der  
Fachmann durch Routineversuche leicht ermitteln.

In der Regel beträgt die Länge der Teilsequenzen mindestens 10 Basen und höchstens 2 kb, bevorzugt mindestens 25 Basen und höchstens 1,5 kb, besonders bevorzugt mindestens 50 Basen und höchstens 600 Basen, ganz besonders bevorzugt mindestens 100 Basen und höchstens 500, am meisten bevorzugt mindestens 200 Basen oder mindestens 300 Basen und höchstens 400 Basen.

Vorzugsweise werden die Teilsequenzen so ausgesucht, dass eine möglichst hohe Spezifität erreicht wird und nicht Aktivitäten anderer Enzyme reduziert werden, deren Verminderung nicht erwünscht ist. Es ist daher vorteilhaft für die Teilsequenzen der  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA Teile des  $\epsilon$ -Cyclase Transkripts und/oder Teilsequenzen der  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-Sequenzen zu wählen, die nicht in anderen Aktivitäten auftreten.

15 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält daher die  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA eine Sequenz, die mit einem Teil der Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Transkripts identisch ist und das 5'-Ende oder das 3'-Ende der Pflanze eigenen Nukleinsäure, kodierend eine  $\epsilon$ -Cyclase 20 enthält. Insbesondere sind nichttranslatierte Bereiche im 5' oder 3' des Transkriptes geeignet, selektive Doppel-Strang-Strukturen herzustellen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung bezieht sich auf doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA-Moleküle), die bei Einbringen in einen pflanzlichen Organismus (oder eine davon abgeleitete Zelle, Gewebe, Organ oder Vermehrungsmaterial) die Verminderung einer  $\epsilon$ -Cyclase bewirken.

30 Ein doppelsträngige RNA-Molekül zur Reduzierung der Expression einer  $\epsilon$ -Cyclase ( $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA) umfasst dabei bevorzugt

- a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil eines "sense"-RNA- $\epsilon$ -Cyclase Transkriptes, und
- b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen, bevorzugt vollständig, komplementären ist.

Zur Transformation der Pflanze mit einer  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA wird bevorzugt ein Nukleinsäurekonstrukt verwendet, das in die Pflanze eingebracht wird und das in der Pflanze in die  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA 45 transkribiert wird.

Daher betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Nukleinsäurekonstrukt, transkribierbar in

- 5 a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA- $\epsilon$ -Cyclase Transkriptes, und
- 10 b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-sense-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementär ist.

Diese Nukleinsäurekonstrukte werden im folgenden auch Expressionskassetten oder Expressionsvektoren genannt.

- 15 In Bezug auf die dsRNA-Moleküle wird unter  $\epsilon$ -Cyclase-Nukleinsäuresequenz, bzw. das entsprechende Transkript bevorzugt die Sequenz gemäß SEQ ID NO: 38 oder ein Teil derselben verstanden.
- 20 "Im wesentlichen identisch" meint, dass die dsRNA Sequenz auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu der  $\epsilon$ -Cyclase Zielsequenz aufweisen kann und dennoch eine effizient Verminderung der Expression bewirkt. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 75 %, bevorzugt mindestens 80 %,
  - 25 ganz besonders bevorzugt mindestens 90 % am meisten bevorzugt 100 % zwischen dem "sense"-Strang einer inhibitorischen dsRNA und mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens, bzw. zwischen dem "antisense"-Strang dem komplementären Strang eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens.
- 30 Eine 100%ige Sequenzidentität zwischen dsRNA und einem  $\epsilon$ -Cyclase Gentranskript ist nicht zwingend erforderlich, um eine effiziente Verminderung der  $\epsilon$ -Cyclase Expression zu bewirken. Demzufolge besteht der Vorteil, dass das Verfahren tolerant ist gegenüber
  - 35 Sequenzabweichungen, wie sie infolge genetischer Mutationen, Polymorphismen oder evolutionärer Divergenzen vorliegen können. So ist es beispielsweise möglich mit der dsRNA, die ausgehend von der  $\epsilon$ -Cyclase Sequenz des einen Organismus generiert wurde, die  $\epsilon$ -Cyclase Expression in einem anderen Organismus zu unterdrücken.
  - 40 Zu diesem Zweck umfasst die dsRNA bevorzugt Sequenzbereiche von  $\epsilon$ -Cyclase-Gentranskripten, die konservierten Bereichen entsprechen. Besagte konservierte Bereiche können aus Sequenzvergleichen leicht abgeleitet werden.
  - 45 Alternativ, kann eine "im wesentlichen identische" dsRNA auch als Nukleinsäuresequenz definiert werden, die befähigt ist, mit einem Teil eines  $\epsilon$ -Cyclase Gentranskriptes zu hybridisieren (z.B. in

400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6,4, 1 mM EDTA bei 50°C oder 70°C für 12 bis 16 h).

"Im wesentlichen komplementär" meint, dass der "antisense"-RNA-Strang auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu dem Komplement des "sense"-RNA-Stranges aufweisen kann. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 80 %, bevorzugt mindestens 90 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 95 %, am meisten bevorzugt 100 % zwischen dem "antisense"-RNA-Strang und dem Komplement des "sense"-RNA-Stranges.

In einer weiteren Ausführungsform umfasst die  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA

- 15 a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes des Promotorbereichs eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens, und
- 20 b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementären ist.

Das entsprechende, bevorzugt zur Transformation der Pflanzen zu verwendende, Nukleinsäurekonstrukt, umfasst

- 25 a) einen "sense"-DNA-Strang der im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des Promotorbereichs eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens, und
- 30 b) einen "antisense"-DNA-Strang, der zu dem DNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementär ist.

Vorzugsweise wird unter dem Promotorbereich einer  $\epsilon$ -Cyclase eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 47 oder ein Teil der selben verstanden.

Zur Herstellung der  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA-Sequenzen zur Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität werden, insbesondere für *Tagetes erecta*, besonders bevorzugt die folgenden Teil-Sequenzen verwendet:

40 SEQ ID NO: 40: Sense-Fragment der 5'terminalen Region der  $\epsilon$ -Cyclase

SEQ ID NO: 41: Antisense-Fragment der 5'terminalen Region der  
45  $\epsilon$ -Cyclase



31

SEQ ID NO: 42: Sense-Fragment der 3'terminalen Region der  $\epsilon$ -Cyclase .

SEQ ID NO: 43: Antisense-Fragment der 3'terminalen Region der  
5  $\epsilon$ -Cyclase

SEQ ID NO: 47: Sense-Fragment des  $\epsilon$ -Cyclase-Promotors

SEQ ID NO: 48: Antisense-Fragment des  $\epsilon$ -Cyclase-Promotors

10 Die dsRNA kann aus einem oder mehr Strängen von Polyribo-  
nukleotiden bestehen. Natürlich können, um den gleichen Zweck  
zu erreichen, auch mehrere individuelle dsRNA Moleküle, die  
jeweils einen der oben definierten Ribonukleotidsequenzabschnitte  
15 umfassen, in die Zelle oder den Organismus eingebracht werden.

Die doppelsträngige dsRNA-Struktur kann ausgehend von zwei kom-  
plementären, separaten RNA-Strängen oder - bevorzugt - ausgehend  
von einem einzelnen, selbstkomplementären RNA-Strang gebildet  
20 werden. In diesem Fall sind "sense"-RNA-Strang und "anti-  
sense"-RNA-Strang bevorzugt kovalent in Form eines invertierten  
"Repeats" miteinander verbunden.

Wie z.B. in WO 99/53050 beschrieben, kann die dsRNA auch eine  
25 Haarnadelstruktur umfassen, indem "sense"- und "antisense"-Strang  
durch eine verbindende Sequenz ("Linker"; beispielsweise ein In-  
tron) verbunden werden. Die selbstkomplementären dsRNA-Strukturen  
sind bevorzugt, da sie lediglich die Expression einer RNA-Sequenz  
erfordern und die komplementären RNA-Stränge stets in einem  
30 äquimolaren Verhältnis umfassen. Bevorzugt ist die verbindende  
Sequenz ein Intron (z.B. ein Intron des ST-LS1 Gens aus Kartof-  
fel; Vancanneyt GF et al. (1990) Mol Gen Genet 220(2):245-250).

Die Nukleinsäuresequenz kodierend für eine dsRNA kann weitere  
35 Elemente beinhalten, wie beispielsweise Transkriptionstermi-  
nationssignale oder Polyadenylierungssignale.

Ist die dsRNA jedoch gegen die Promotorsequenz einer  $\epsilon$ -Cyclase  
gerichtet, so umfasst sie bevorzugt keine Transkriptionstermi-  
40 nationssignale oder Polyadenylierungssignale. Dies ermöglicht  
eine Retention der dsRNA im Nukleus der Zelle und verhindert  
eine Verteilung der dsRNA in der gesamten Pflanze "Spreading").

## 32

Sollen die zwei Stränge der dsRNA in einer Zelle oder Pflanze zusammengebracht werden, so kann dies beispielhaft auf folgende Art geschehen:

- 5 a) Transformation der Zelle oder Pflanze mit einem Vektor, der beide Expressionskassetten umfasst,
- b) Kotransformation der Zelle oder Pflanze mit zwei Vektoren, wobei der eine die Expressionskassetten mit dem "sense"-Strang, der andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.
- 10 c) Kreuzung von zwei individuellen Pflanzenlinien, wobei die eine die Expressionskassetten mit dem "sense"-Strang, die andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.
- 15

Die Bildung der RNA Duplex kann entweder außerhalb der Zelle oder innerhalb derselben initiiert werden.

20

Die dsRNA kann entweder in vivo oder in vitro synthetisiert werden. Dazu kann eine DNA-Sequenz kodierend für eine dsRNA in eine Expressionskassette unter Kontrolle mindestens eines genetischen Kontrollelementes (wie beispielsweise einem Promotor) gebracht werden. Eine Polyadenylierung ist nicht erforderlich, ebenso müssen keine Elemente zur Initiierung einer Translation vorhanden sein. Bevorzugt ist die Expressionskassette für die MP-dsRNA auf dem Transformationskonstrukt oder dem Transformationsvektor enthalten.

30

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Expression der dsRNA ausgehend von einem Expressionskonstrukt unter funktioneller Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors, besonders bevorzugt unter der Kontrolle des Promotors beschrieben durch SEQ ID NO: 28 oder eines funktionell äquivalenten Teils desselben.

Die Expressionskassetten kodierend für den "antisense"- und/oder den "sense"-Strang einer  $\epsilon$ -Cyclase -dsRNA oder für den selbstkomplementären-Strang der dsRNA, werden dazu bevorzugt in einen Transformationsvektor insertiert und mit den unten beschriebenen Verfahren in die pflanzliche Zelle eingebracht. Für das erfindungsgemäße Verfahren ist eine stabile Insertion in das Genom vorteilhaft.

45

## 33

Die dsRNA kann in einer Menge eingeführt werden, die zumindest eine Kopie pro Zelle ermöglicht. Höhere Mengen (z.B. mindestens 5, 10, 100, 500 oder 1000 Kopien pro Zelle) können ggf. eine effizienter Verminderung bewirken.

5

- b) Einbringen einer antisense-Ribonukleinsäuresequenz einer  $\epsilon$ -Cyclase ( $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA)

- Verfahren zur Verminderung eines bestimmten Proteins durch die
- 10 "antisense"-Technologie sind vielfach - auch in Pflanzen - beschrieben (Sheehy et al. (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85: 8805-8809; US 4,801,340; Mol JN et al. (1990) FEBS Lett 268(2):427-430). Das antisense Nukleinsäuremolekül hybridisiert bzw. bindet mit der zellulären mRNA und/oder genomischen DNA
- 15 kodierend für das zu vermindernende  $\epsilon$ -Cyclase. Dadurch wird die Transkription und/oder Translation der  $\epsilon$ -Cyclase unterdrückt. Die Hybridisierung kann auf konventionelle Art über die Bildung einer stabilen Duplex oder - im Fall von genomischer DNA - durch Bindung des antisense Nukleinsäuremoleküls mit der Duplex der
- 20 genomischen DNA durch spezifische Wechselwirkung in der großen Furche der DNA-Helix entstehen.

- Eine  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA kann unter Verwendung der für diese  $\epsilon$ -Cyclase kodierenden Nukleinsäuresequenz, beispielsweise
- 25 der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 38 nach den Basenpaarregeln von Watson und Crick abgeleitet werden. Die  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA kann zu der gesamten transkribierten mRNA der  $\epsilon$ -Cyclase komplementär sein, sich auf die kodierende Region beschränken oder nur aus einem Oligonukleotid bestehen, das zu einem Teil der
- 30 kodierenden oder nicht-kodierenden Sequenz der mRNA komplementär ist. So kann das Oligonukleotid beispielsweise komplementär zu der Region sein, die den Translationsstart für die  $\epsilon$ -Cyclase umfasst. Die  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA kann eine Länge von zum Beispiel 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 oder 50 Nukleotide haben, kann
- 35 aber auch länger sein und mindestens 100, 200, 500, 1000, 2000 oder 5000 Nukleotide umfassen.  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNAs werden im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens bevorzugt rekombinant in der Zielzelle exprimiert..

- 40 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft transgene Expressionskassetten enthaltend eine Nukleinsäuresequenz kodierend für zumindest einen Teil einer  $\epsilon$ -Cyclase, wobei besagte Nukleinsäuresequenz mit einem in pflanzlichen Organismen funktionellen Promotor in antisense-Orientierung funktionell verknüpft ist. In einer
- 45 besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Expression der antisenseRNA ausgehend von einem Expressionskonstrukt unter funktioneller Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors, besonders

bevorzugt unter der Kontrolle des Promotors beschrieben durch SEQ ID NO: 28 oder eines funktionell äquivalenten Teils desselben.

Besagte Expressionskassetten können Teil eines Transformations-  
 5 konstrukt oder Transformationsvektors sein, oder aber auch im Rahmen einer Kotransformation eingeführt werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann die Expression einer  $\epsilon$ -Cyclase durch Nukleotidsequenzen inhibiert werden, die  
 10 komplementär zu der regulatorischen Region eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens (z.B. einem  $\epsilon$ -Cyclase Promoter und/oder Enhancer) sind und triple-helikale Strukturen mit der dortigen DNA-Doppelhelix ausbilden, so dass die Transkription des  $\epsilon$ -Cyclase-Gens reduziert wird. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (Helene C (1991) Anticancer  
 15 Drug Res 6(6):569-84; Helene C et al. (1992) Ann NY Acad Sci 660:27-36; Maher LJ (1992) Bioassays 14(12):807- 815).

In einer weiteren Ausführungsform kann die  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA eine  $\alpha$ -anomere Nukleinsäure sein. Derartige  $\alpha$ -anomere Nukleinsäuremoleküle bilden spezifische doppelsträngige Hybride mit  
 20 komplementärer RNA in denen, - im Unterschied zu den konventionellen  $\beta$ -Nukleinsäuren - die beiden Stränge parallel zueinander verlaufen (Gautier C et al. (1987) Nucleic Acids Res 15:6625-6641).

25

c) Einbringen einer  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA kombiniert mit einem Ribozym

Vorteilhaft kann die oben beschriebene antisense-Strategie mit  
 30 einem Ribozym-Verfahren gekoppelt werden. Katalytische RNA-Moleküle oder Ribozyme können an jede beliebige Ziel-RNA angepasst werden und spalten das Phosphodiester-Gerüst an spezifischen Positionen, wodurch die Ziel-RNA funktionell deaktiviert wird (Tanner NK (1999) FEMS Microbiol Rev 23(3):257-275). Das Ribozym  
 35 wird dadurch nicht selber modifiziert, sondern ist in der Lage, weitere Ziel-RNA-Moleküle analog zu spalten, wodurch es die Eigenschaften eines Enzyms erhält. Der Einbau von Ribozymsequenzen in "antisense"-RNAs verleiht eben diesen "antisense"-RNAs diese enzymähnliche, RNA-spaltende Eigenschaft und steigert so deren  
 40 Effizienz bei der Inaktivierung der Ziel-RNA. Die Herstellung und Verwendung entsprechender Ribozym-"antisense"-RNA-Moleküle ist beschrieben (u.a. bei Haseloff et al. (1988) Nature 334: 585-591); Haselhoff und Gerlach (1988) Nature 334:585-591; Steinecke P et al. (1992) EMBO J 11(4):1525-1530; de Feyter R  
 45 et al. (1996) Mol Gen Genet. 250(3):329-338).

Auf diese Art können Ribozyme (z.B. "Hammerhead"-Ribozyme; Haselhoff und Gerlach (1988) Nature 334:585-591) verwendet werden, um die mRNA eines zu vermindernenden  $\epsilon$ -Cyclases katalytisch zu spalten und so die Translation zu verhindern. Die Ribozym-Technologie kann die Effizienz einer antisense-Strategie erhöhen. Verfahren zur Expression von Ribozymen zur Verminderung bestimmter Proteine sind beschrieben in (EP 0 291 533, EP 0 321 201, EP 0 360 257). In pflanzlichen Zellen ist eine Ribozym-Expression ebenfalls beschrieben (Steinecke P et al. (1992) EMBO J 11(4):1525-1530; de Feyter R et al. (1996) Mol Gen Genet. 250(3):329-338). Geeignete Zielsequenzen und Ribozyme können zum Beispiel wie bei "Steinecke P, Ribozymes, Methods in Cell Biology 50, Galbraith et al. eds, Academic Press, Inc. (1995), S. 449-460" beschrieben, durch Sekundärstrukturberechnungen von Ribozym- und Ziel-RNA sowie durch deren Interaktion bestimmt werden (Bayley CC et al. (1992) Plant Mol Biol. 18(2):353-361; Lloyd AM and Davis RW et al. (1994) Mol Gen Genet. 242(6):653-657). Beispielsweise können Derivate der Tetrahymena L-19 IVS RNA konstruiert werden, die komplementäre Bereiche zu der mRNA des zu supprimierenden  $\epsilon$ -Cyclases aufweisen (siehe auch US 4,987,071 und US 5,116,742). Alternativ können solche Ribozyme auch über einen Selektionsprozess aus einer Bibliothek diverser Ribozyme identifiziert werden (Bartel D und Szostak JW (1993) Science 261:1411-1418).

- 25 d) Einbringen einer sense-Ribonukleinsäuresequenz einer  $\epsilon$ -Cyclase ( $\epsilon$ -Cyclase-senseRNA) zur Induktion einer Kosuppression

Die Expression einer  $\epsilon$ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz (oder eines Teils derselben) in sense-Orientierung kann zu einer Kosuppression des entsprechenden  $\epsilon$ -Cyclase-Gens führen. Die Expression von sense-RNA mit Homologie zu einem endogenen  $\epsilon$ -Cyclasegen kann die Expression desselben vermindern oder ausschalten, ähnlich wie es für antisense Ansätze beschrieben wurde (Jorgensen et al. (1996) Plant Mol Biol 31(5):957-973; Goring et al. (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:1770-1774; Smith et al. (1990) Mol Gen Genet 224:447-481; Napoli et al. (1990) Plant Cell 2:279-289; Van der Krol et al. (1990) Plant Cell 2:291-99). Dabei kann das eingeführte Konstrukt das zu vermindernende, homologe Gen ganz oder nur teilweise repräsentieren. Die Möglichkeit zur Translation ist nicht erforderlich. Die Anwendung dieser Technologie auf Pflanzen ist beschrieben (z.B. Napoli et al. (1990) Plant Cell 2:279-289; in US 5,034,323).

Bevorzugt wird die Kosuppression unter Verwendung einer Sequenz realisiert, die im wesentlichen identisch ist zu zumindest einem Teil der Nukleinsäuresequenz kodierend für eine  $\epsilon$ -Cyclase, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 38.

## 36

Bevorzugt ist die  $\epsilon$ -Cyclase-senseRNA so gewählt, dass es nicht zu einer Translation der  $\epsilon$ -Cyclase oder eines Teils desselben kommen kann. Dazu kann beispielsweise der 5'-untranslatierte oder 3'-untranslatierte Bereich gewählt oder aber das ATG-Startkodon deletiert oder mutiert werden.

e) Einbringen von DNA-oder Protein-bindende Faktoren gegen  $\epsilon$ -Cyclase Gene, -RNAs oder Proteine

- 10 Eine Verminderung einer  $\epsilon$ -Cyclase Expression ist auch mit spezifischen DNA-bindenden Faktoren z.B. mit Faktoren vom Typ der Zinkfingertranskriptionsfaktoren möglich. Diese Faktoren lagern sich an die genomische Sequenz des endogenen Zielgens, bevorzugt in den regulatorischen Bereichen, an und bewirken eine Verminderung der Expression. Entsprechende Verfahren zur Herstellung entsprechender Faktoren sind beschrieben (Dreier B et al. (2001) J Biol Chem 276(31):29466-78; Dreier B et al. (2000) J Mol Biol 303(4):489-502; Beerli RR et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97 (4):1495-1500; Beerli RR et al. (2000) J Biol Chem 275(42):32617-32627; Segal DJ and Barbas CF 3rd. (2000) Curr Opin Chem Biol 4(1):34-39; Kang JS and Kim JS (2000) J Biol Chem 275(12):8742-8748; Beerli RR et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(25):14628-14633; Kim JS et al. (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94(8):3616-3620; Klug A (1999) J Mol Biol 293(2):215-218; Tsai SY et al. (1998) Adv Drug Deliv Rev 30(1-3):23-31; Mapp AK et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97(8):3930-3935; Sharrocks AD et al. (1997) Int J Biochem Cell Biol 29(12):1371-1387; Zhang L et al. (2000) J Biol Chem 275(43):33850-33860).
- 30 Die Selektion dieser Faktoren kann unter Verwendung eines beliebigen Stückes eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens erfolgen. Bevorzugt liegt dieser Abschnitt im Bereich der Promotorregion. Für eine Genunterdrückung kann er aber auch im Bereich der kodierenden Exons oder Introns liegen.
- 35 Ferner können Faktoren in eine Zelle eingebracht werden, die die  $\epsilon$ -Cyclase selber inhibieren. Diese proteinbindenden Faktoren können z.B. Aptamere (Famulok M und Mayer G (1999) Curr Top Microbiol Immunol 243:123-36) oder Antikörper bzw. Antikörperfragmente oder einzelkettige Antikörper sein. Die Gewinnung dieser Faktoren ist beschrieben (Owen M et al. (1992) Biotechnology (N Y) 10(7):790-794; Franken E et al. (1997) Curr Opin Biotechnol 8(4):411-416; Whitelam (1996) Trend Plant Sci 1:286-272).

- f) Einbringen von den  $\epsilon$ -Cyclase RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequenzen und Expressionskonstrukten

Die  $\epsilon$ -Cyclase Expression kann effektiv auch durch Induktion des spezifischen  $\epsilon$ -Cyclase RNA-Abbaus durch die Pflanze mit Hilfe eines viralen Expressionssystems (Amplikon; Angell SM et al. (1999) Plant J 20(3):357-362) realisiert werden. Diese Systeme - auch als "VIGS" (viral induced gene silencing) bezeichnet - bringen Nukleinsäuresequenzen mit Homologie zu dem Transkript einer zu vermindernenden  $\epsilon$ -Cyclase mittels viraler Vektoren in die Pflanze ein. Die Transkription wird sodann - vermutlich mediert durch pflanzliche Abwehrmechanismen gegen Viren - abgeschaltet. Entsprechende Techniken und Verfahren sind beschrieben (Ratcliff F et al. (2001) Plant J 25(2):237-45; Fagard M und Vaucheret H (2000) Plant Mol Biol 43(2-3):285-93; Anandalakshmi R et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(22):13079-84; Ruiz MT (1998) Plant Cell 10(6):937-46).

Bevorzugt wird die VIGS-vermittelte Verminderung unter Verwendung einer Sequenz realisiert, die im wesentlichen identisch ist zu zumindest einem Teil der Nukleinsäuresequenz kodierend für ein  $\epsilon$ -Cyclase, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 38.

- g) Einbringen von Konstrukten zur Erzeugung eines Funktionsverlustes oder einer Funktionsminderung an  $\epsilon$ -Cyclase-Genen

Dem Fachmann sind zahlreiche Verfahren bekannt, wie genomische Sequenzen gezielt modifiziert werden können. Dazu zählen insbesondere Verfahren wie die Erzeugung von Knockout-Mutanten mittels gezielter homologen Rekombination z.B. durch Generierung von Stopp-Kodons, Verschiebungen im Leseraster etc. (Hohn B und Puchta H (1999) Proc Natl Acad Sci USA 96:8321-8323) oder die gezielte Deletion oder Inversion von Sequenzen mittels z.B. sequenzspezifischer Rekombinasen oder Nukleasen (s.u.)

Die Verminderung der  $\epsilon$ -Cyclase-Menge, -Funktion und/oder -Aktivität kann auch durch eine gezielte Insertion von Nukleinsäuresequenzen (z.B. der im Rahmen der erfindungsgemäßen Verfahrens zu insertierenden Nukleinsäuresequenz) in die Sequenz kodierend für eine  $\epsilon$ -Cyclase (z.B. mittels intermolekularer homologer Rekombination) realisiert werden. Im Rahmen dieser Ausführungsform verwendet man bevorzugt ein DNA-Konstrukt, das zumindest einen Teil der Sequenz eines  $\epsilon$ -Cyclasegens oder benachbarter Sequenzen umfasst, und so mit diesen in der Zielzelle gezielt rekombinieren kann, so dass durch eine Deletion, Addition oder Substitution mindestens eines Nukleotids das  $\epsilon$ -Cyclase-Gen so ver-

- ändert wird, dass die Funktionalität des  $\epsilon$ -Cyclase-Gens reduziert oder gänzlich aufgehoben wird. Die Veränderung kann auch die regulativen Elemente (z.B. den Promotor) des  $\epsilon$ -Cyclase-Gens betreffen, so dass die kodierende Sequenz unverändert bleibt, eine Expression (Transkription und/oder Translation) jedoch unterbleibt und reduziert wird. Bei der konventionellen homologen Rekombination ist die zu insertierende Sequenz an ihrem 5'- und/oder 3'-Ende von weiteren Nukleinsäuresequenzen (A' bzw. B') flankiert, die eine ausreichende Länge und Homologie zu entsprechenden Sequenzen des  $\epsilon$ -Cyclase-Gens (A bzw. B) für die Ermöglichung der homologen Rekombination aufweisen. Die Länge liegt in der Regel in einem Bereich von mehreren hundert Basen bis zu mehreren Kilobasen (Thomas KR und Capecchi MR (1987) Cell 51:503; Strepp et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(8):4368-4373). Für die homologe Rekombination wird die pflanzliche Zelle mit dem Rekombinationskonstrukt unter Verwendung der unten beschriebenen Verfahren transformiert und erfolgreich rekombinierte Klone basierend auf der infolge inaktivierten  $\epsilon$ -Cyclase selektioniert.
- 20 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die Effizienz der Rekombination gesteigert durch Kombination mit Verfahren, die die homologe Rekombination fördern. Solche Verfahren sind beschrieben und umfassen beispielhaft die Expression von Proteinen wie RecA oder die Behandlung mit PARP-Inhibitoren. Es konnte gezeigt werden, dass die intrachromosomale homologe Rekombination in Tabakpflanzen durch die Verwendung von PARP-Inhibitoren erhöht werden kann (Puchta H et al. (1995) Plant J 7:203-210). Durch den Einsatz dieser Inhibitoren kann die Rate der homologen Rekombination in den Rekombinationskonstrukten nach Induktion des sequenzspezifischen DNA-Doppelstrangbruches und damit die Effizienz der Deletion der Transgensequenzen weiter erhöht werden. Verschiedene PARP Inhibitoren können dabei zum Einsatz kommen. Bevorzugt umfasst sind Inhibitoren wie 3-Aminobenzamid, 8-Hydroxy-2-methylquinazolin-4-on (NU1025), 1,11b-Dihydro-[2H]benzopyrano-[4,3,2-de]isoquinolin-3-on (GPI 6150), 5-Aminoisoquinolinon, 3,4-Dihydro-5-[4-(1-piperidinyloxy)]-1(2H)-isoquinolinon oder die in WO 00/26192, WO 00/29384, WO 00/32579, WO 00/64878, WO 00/68206, WO 00/67734, WO 01/23386 und WO 01/23390 beschriebenen Substanzen.
- 40 Weitere geeignete Methoden sind die Einführung von Nonsense-Mutationen in endogene Markerprotein Gene zum Beispiel mittels Einführung von RNA/DNA-Oligonukleotiden in die Pflanze (Zhu et al. (2000) Nat Biotechnol 18(5):555-558) oder die Generierung von Knockout-Mutanten mit Hilfe von z.B. T-DNA-Mutagenese (Koncz et al., Plant Mol. Biol. 1992, 20(5):963-976). Punktmutationen können auch mittels DNA-RNA Hybriden erzeugt werden, die auch als



"chimeraplasty" bekannt sind (Cole-Strauss et al. (1999) Nucl Acids Res 27(5):1323-1330; Kmiec (1999) Gene therapy American Scientist 87(3):240-247).

- 5 Die Methoden der dsRNAi, der Kosuppression mittels sense-RNA und der "VIGS" ("virus induced gene silencing") werden auch als "post-transcriptional gene silencing" (PTGS) oder transcriptional gene silencing" (TGS) bezeichnet. PTGS/TGS-Verfahren sind besonders vorteilhaft, weil die Anforderungen an die Homologie zwischen dem zu vermindernenden Markerprotein-Gen und der transgen exprimierten sense- oder dsRNA-Nukleinsäuresequenz geringer sind als beispielsweise bei einem klassischen antisense-Ansatz. So kann man unter Verwendung der Markerprotein-Nukleinsäuresequenzen aus einer Art auch die Expression von homologen Markerprotein-
- 10 Proteinen in anderen Arten effektiv vermindern, ohne, dass die Isolierung und Strukturaufklärung der dort vorkommenden Markerprotein-Homologen zwingend erforderlich wäre. Dies erleichtert erheblich den Arbeitsaufwand.
- 15
- 20 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch:
- a) Einbringen mindestens einer doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen und/oder
- 25 b) Einbringen mindestens einer  $\epsilon$ -Cyclase antisense-Ribonukleinsäuresequenzen oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette in Pflanzen.
- 30
- In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch Einbringen mindestens einer doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen.
- 35

- In einer bevorzugten Ausführungsform werden genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in Blüten die geringste Expressionsrate einer  $\epsilon$ -Cyclase aufweisen.
- 40

Dies wird bevorzugt dadurch erreicht, dass die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität blütenspezifisch, besonders bevorzugt blütenblattspezifisch erfolgt.

In der vorstehend beschriebenen, besonders bevorzugten Ausführungsform wird dies dadurch erreicht, dass die Transkription der  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA-Sequenzen unter Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors oder noch bevorzugter unter Kontrolle eines Blütenblattspezifischen Promotors erfolgt.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform werden Pflanzen kultiviert, die zusätzlich gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität, Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase-Aktivität, Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Phytoen-Synthase-Aktivität, Phytoen-Desaturase-Aktivität, Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität, crtISO-Aktivität, FtsZ-Aktivität und MinD-Aktivität aufweisen.

Unter HMG-CoA-Reduktase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer HMG-CoA-Reduktase (3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzym-A-Reduktase) verstanden.

Unter einer HMG-CoA-Reduktase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzym-A in Mevalonat umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter HMG-CoA-Reduktase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein HMG-CoA-Reduktase umgesetzte Menge 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzym-A bzw. gebildete Menge Mevalonat verstanden.

Bei einer erhöhten HMG-CoA-Reduktase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein HMG-CoA-Reduktase die umgesetzte Menge 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzym-A bzw. die gebildete Menge Mevalonat erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität des Wildtyps. Unter HMG-CoA-Reduktase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer HMG-CoA-Reduktase verstanden.

## 41

Die Bestimmung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität in erfindungs-  
gemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Refe-  
renzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

- 5 Eingefrorenes Pflanzenmaterial wird durch intensives Mösern in  
flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit Extraktionspuffer in  
einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 extrahiert. Das jeweilige  
Verhältnis richtet sich nach den Enzymaktivitäten in dem verfüg-  
baren Pflanzenmaterial, sodaß eine Bestimmung und Quantifizierung  
10 der Enzymaktivitäten innerhalb des linearen Messbereiches mög-  
licht ist. Typischerweise kann der Extraktionspuffer bestehen aus  
50 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM  
EGTA, 0.1% (v/v) Triton X-100, 2 mM ε-Aminocapronsäure, 10% Glyze-  
rin, 5 mM KHCO<sub>3</sub>. Kurz vor der Extraktion wird 2 mM DTT und 0.5 mM  
15 PMSF zugegeben.

Die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase kann nach veröffentlichten Be-  
schreibungen gemessen werden (z.B. Schaller, Grausem, Benveniste,  
Chye, Tan, Song und Chua, Plant Physiol. 109 (1995), 761-770;

- 20 Chappell, Wolf, Proulx, Cuellar und Saunders, Plant Physiol. 109  
(1995) 1337-1343). Pflanzengewebe kann in kaltem Puffer (100 mM  
Kaliumphosphat (pH 7.0), 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT) homogenisiert und  
extrahiert werden. Das Homogenisat wird 15 Minuten lang bei  
10.000g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird danach bei  
25 100.000g für 45-60 Minuten nochmals zentrifugiert. Die Aktivität  
der HMG-CoA-Reduktase wird im Überstand und im Pellet der mikro-  
somalen Fraktion (nach dem Resuspendieren in 100 mM Kalium-  
phosphat (pH 7.0) und 50 mM DTT) bestimmt. Aliquots der Lösung  
und der Suspension (der Proteingehalt der Suspension entspricht  
30 etwa 1-10 µg) werden in 100 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,0 mit  
3 mM NADPH und 20 µM (<sup>14</sup>C)HMG-CoA (58 µCi/µM) idealerweise in  
einem Volumen von 26 µl für 15-60 Minuten bei 30°C inkubiert. Die  
Reaktion wird terminiert durch die Zugabe von 5 µl Mevalonatlac-  
ton (1 mg/ml) und 6 N HCl. Nach Zugabe wird die Mischung bei  
35 Raumtemperatur 15 Minuten inkubiert. Das in der Reaktion gebil-  
dete (<sup>14</sup>C)-Mevalonat wird quantifiziert, indem 125 µl einer gesät-  
tigten Kaliumphosphat-Lösung (pH 6.0) und 300 µl Ethylacetat zu-  
gegeben werden. Die Mischung wird gut vermischt und zentrifu-  
giert. Mittels Szintillationsmessung kann die Radioaktivität be-  
40 stimmt werden.

Unter (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Akti-  
vität, auch lytB oder IspH bezeichnet, wird die Enzymaktivität  
einer (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase

45 verstanden.

Unter einer (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat in Isopentenylidiphosphat und Dimethylallyldiphosphate umzuwandeln.

5

Dementsprechend wird unter (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase umgesetzte Menge (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat bzw.

10 gebildete Menge Isopentenylidiphosphat und/oder Dimethylallyldiphosphat verstanden.

Bei einer erhöhten (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase -Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Ver-

15 gleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase die umgesetzte Menge (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat bzw. die gebildete Menge Isopentenylidiphosphat und/oder Dimethylallyldiphosphat erhöht.

20

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, 25

noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase -Aktivität des Wildtyps.

Die Bestimmung der (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-

30 Reduktase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

Eingefrorenes Pflanzenmaterial wird durch intensives Mösern in

35 flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit Extraktionspuffer in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 extrahiert. Das jeweilige Verhältnis richtet sich nach den Enzymaktivitäten in dem verfügbaren Pflanzenmaterial, sodaß eine Bestimmung und Quantifizierung der Enzymaktivitäten innerhalb des linearen Messbereiches möglich 40 ist. Typischerweise kann der Extraktionspuffer bestehen aus 50 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM  $\epsilon$ -Aminocaprinsäure, 10 % Glycerin, 5 mM KHCO<sub>3</sub>. Kurz vor der Extraktion wird 2 mM DTT und 0,5 mM PMSF zugegeben.

45

Die Bestimmung der (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität kann über einen immunologischen Nachweis erbracht werden. Die Herstellung spezifischer Antikörper ist durch Rohdich und Kollegen (Rohdich, Hecht, Gärtner, Adam, Krieger, Amslinger, Arigoni, Bacher und Eisenreich: Studies on the non-mevalonate terpene biosynthetic pathway: metabolic role of IspH (LytB) protein, Natl. Acad. Natl. Sci. USA 99 (2002), 1158-1163) beschrieben worden. Zur Bestimmung der katalytischen Aktivität beschreiben Altincicek und Kollegen (Altincicek, Duin, Reichenberg, Hedderich, Kollas, Hintz, Wagner, Wiesner, Beck und Jomaa: LytB protein catalyzes the terminal step of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis; FEBS Letters 532 (2002,) 437-440) ein in vitro-System, welches die Reduktion von (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl diphosphat in die Isopentenylidiphosphat und Dimethylallyldiphosphat verfolgt.

Unter 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase verstanden.

20

Unter einer 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Hydroxyethyl-ThPP und Glycerinaldehyd-3-Phosphat in 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat umzuwandeln.

25

Dementsprechend wird unter 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase umgesetzte Menge Hydroxyethyl-ThPP und/oder Glycerinaldehyd-3-Phosphat bzw. gebildete Menge -Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat verstanden.

30

Bei einer erhöhten 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase -Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase die umgesetzte Menge Hydroxyethyl-ThPP und/oder Glycerinaldehyd-3-Phosphat bzw. die gebildete Menge -Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat erhöht.

35

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase -Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität des Wildtyps.

45

Die Bestimmung der 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

- 5 Eingefrorenes Pflanzenmaterial wird durch intensives Mösern in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit Extraktionspuffer in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 extrahiert. Das jeweilige Verhältnis richtet sich nach den Enzymaktivitäten in dem verfügbaren Pflanzenmaterial, sodaß eine Bestimmung und Quantifizierung der Enzymaktivitäten innerhalb des linearen Messbereiches möglich ist. Typischerweise kann der Extraktionspuffer bestehen aus 50 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM  $\epsilon$ -Aminocapronsäure, 10 % Glycerin, 5 mM KHCO<sub>3</sub>. Kurz vor der Extraktion wird 2 mM DTT und 0,5 mM PMSF zugegeben.

- Die Reaktionslösung (50-200  $\mu$ l) für die Bestimmung der D-1-Deoxyxylulose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität (DXS) besteht aus 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 mM MnCl<sub>2</sub>, 3 mM ATP, 1 mM Thiamindiphosphat, 0.1% Tween-60, 1 mM Kaliumfluorid, 30  $\mu$ M (2-<sup>14</sup>C)-Pyruvat (0.5  $\mu$ Ci), 0.6 mM DL-Glycerinaldehyd-3-phosphat. Der Pflanzenextrakt wird 1 bis 2 Stunden in der Reaktionslösung bei 37°C inkubiert. Danach wird die Reaktion durch Erhitzen auf 80°C für 3 Minuten gestoppt. Nach Zentrifugation bei 13.000 Umdrehungen/Minute für 5 Minuten wird der Überstand evaporiert, der Rest in 50  $\mu$ l Methanol resuspendiert, auf eine TLC-Platte für Dünnschichtchromatographie (Silica-Gel 60, Merck, Darmstadt) aufgetragen und in N-Propylalkohol/Ethylacetat/Wasser (6:1:3; v/v/v) aufgetrennt. Dabei trennt sich radioaktiv markiertes D-1-deoxyxylulose-5-phosphat (oder D-1-deoxyxylulose) von (2-<sup>14</sup>C)-Pyruvat. Die Quantifizierung erfolgt mittels Scintillationszähler. Die Methode wurde beschrieben in Harker und Bramley (FEBS Letters 448 (1999) 115-119). Alternativ wurde ein fluorometrischer Assay zur Bestimmung der DXS-Synthaseaktivität von Querol und Kollegen beschrieben (Analytical Biochemistry 296 (2001) 101-105).

- Unter 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase, auch 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Reduktoisomerase genannt, verstanden.

- Unter einer 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat in  $\beta$ -Carotin umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase -Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase umgesetzte Menge 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat bzw. gebildete Menge Isopen-  
 5 tenyl-Diphosphat verstanden.

Bei einer erhöhten 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein 1-Deoxy-D-  
 10 Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase die umgesetzte Menge 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat bzw. die gebildete Menge Isopentenyl-Diphosphat erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase -Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt  
 15 mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität des Wildtyps.

20 Die Bestimmung der 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase -Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

25 Eingefrorenes Pflanzenmaterial wird durch intensives Mösern in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit Extraktionspuffer in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 extrahiert. Das jeweilige Verhältnis richtet sich nach den Enzymaktivitäten in dem verfügbaren Pflanzenmaterial, sodaß eine Bestimmung und Quantifizierung  
 30 der Enzymaktivitäten innerhalb des linearen Messbereiches möglich ist. Typischerweise kann der Extraktionspuffer bestehen aus 50 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM  $\epsilon$ -Aminocaprinsäure, 10 % Gly-  
 35 zerin, 5 mM KHCO<sub>3</sub>. Kurz vor der Extraktion wird 2 mM DTT und 0,5 mM PMSF zugegeben.

Die Aktivität der D-1-Deoxyxylulose-5-Phosphat-Reduktoisomerase (DXR) wird gemessen in einem Puffer aus 100 mM Tris-HCl (pH 7,5),  
 40 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 0,3 mM NADPH und 0,3 mM 1-Deoxy-D-Xylulose-4-Phosphat, welches z.B. enzymatisch synthetisiert werden kann (Kuzuyama, Takahashi, Watanabe und Seto: Tetrahedon letters 39 (1998) 4509-4512). Die Reaktion wird durch Zugabe des Pflanzenextraktes gestartet. Das Reaktionsvolumen kann typischerweise 0,2 bis 0,5 mL  
 45 betragen; die Inkubation erfolgt bei 37°C über 30-60 Minuten.

Während dieser Zeit wird die Oxidation von NADPH photometrisch bei 340 nm verfolgt.

Unter Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase -Aktivität wird die Enzymaktivität einer Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase verstanden.

Unter einer Isopentenyl-Diphosphat-D-Isomerase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Isopentenyl-Diphosphat in Dimethylallylphosphat umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Isopentenyl-Diphosphat-D-Isomerase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Isopentenyl-Diphosphat-D-Isomerase umgesetzte Menge Isopentenyl-Diphosphat bzw. gebildete Menge Dimethylallylphosphat verstanden.

Bei einer erhöhten Isopentenyl-Diphosphat-D-Isomerase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Isopentenyl-Diphosphat-D-Isomerase die umgesetzte Menge Isopentenyl-Diphosphat bzw. die gebildete Menge Dimethylallylphosphat erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase -Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase Aktivität des Wildtyps.

Die Bestimmung der Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

Eingefrorenes Pflanzenmaterial wird durch intensives Mösern in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit Extraktionspuffer in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 extrahiert. Das jeweilige Verhältnis richtet sich nach den Enzymaktivitäten in dem verfügbaren Pflanzenmaterial, sodaß eine Bestimmung und Quantifizierung der Enzymaktivitäten innerhalb des linearen Messbereiches möglich ist. Typischerweise kann der Extraktionspuffer bestehen aus 50 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM  $\epsilon$ -Aminocaprinsäure, 10 % Glycerin, 5 mM KHCO<sub>3</sub>. Kurz vor der Extraktion wird 2 mM DTT und 0,5 mM PMSF zugegeben.



Aktivitätsbestimmungen der Isopentenyl-Diphosphat-Isomerase (IPP-Isomerase) können nach der von Fraser und Kollegen vorgestellten Methode (Fraser, Römer, Shipton, Mills, Kiano, Misawa, Drake, Schuch und Bramley: Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 (2002), 1092-1097, basierend auf Fraser, Pinto, Holloway und Bramley, Plant Journal 24 (2000), 551-558) durchgeführt werden. Für Enzymmessungen werden Inkubationen mit 0,5  $\mu$ Ci ( $1\text{-}^{14}\text{C}$ )IPP (Isopentenylpyrophosphat) (56 mCi/mmol, Amersham plc) als Substrat in 0,4 M Tris-HCl (pH 8,0) mit 1 mM DTT, 4 mM  $\text{MgCl}_2$ , 6 mM  $\text{MnCl}_2$ , 3 mM ATP, 0,1 % Tween 60, 1 mM Kaliumfluorid in einem Volumen von etwa 150-500  $\mu$ l durchgeführt. Extrakte werden mit Puffer gemischt (z.B. im Verhältnis 1:1) und für wenigstens 5 Stunden bei 28°C inkubiert. Danach wird etwa 200  $\mu$ l Methanol zugegeben und durch Zugabe von konzentrierter Salzsäure (Endkonzentration 25 %) eine Säurehydrolyse für etwa 1 Stunde bei 37°C durchgeführt. Anschließend erfolgt eine zweimalige Extraktion (jeweils 500  $\mu$ l) mit Petrolether (versetzt mit 10% Diethylether). Die Radioaktivität in einem Aliquot der Hyperphase wird mittels Szintillationszähler bestimmt. Die spezifische Enzymaktivität kann bei kurzer Inkubation von 5 Minuten bestimmt werden, da kurze Reaktionszeiten die Bildung von Reaktionsnebenprodukten unterdrückt (siehe Lützow und Beyer: The isopentenyl-diphosphate  $\Delta$ -isomerase and its relation to the phytoene synthase complex in daffodil chromoplasts; Biochim. Biophys. Acta 959 (1988), 118-126)

Unter Geranyl-Diphosphat-Synthase -Aktivität wird die Enzymaktivität einer Geranyl-Diphosphat-Synthase verstanden.

Unter einer Geranyl-Diphosphat-Synthase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Isopentenyl-Diphosphat und Dimethylallylphosphat in Geranyl-Diphosphat umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Geranyl-Diphosphat-Synthase umgesetzte Menge Isopentenyl-Diphosphat und/oder Dimethylallylphosphat bzw. gebildete Menge Geranyl-Diphosphat verstanden.

Bei einer erhöhten Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Geranyl-Diphosphat-Synthase die umgesetzte Menge Isopentenyl-Diphosphat und/oder Dimethylallylphosphat bzw. die gebildete Menge Geranyl-Diphosphat erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Geranyl-Diphosphat-Synthase -Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter 5 mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität des Wildtyps.

Die Bestimmung der Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp-  
10 bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

Eingefrorenes Pflanzenmaterial wird durch intensives Mösern in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit Extraktionspuffer  
15 in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 extrahiert. Das jeweilige Verhältnis richtet sich nach den Enzymaktivitäten in dem verfügbaren Pflanzenmaterial, sodaß eine Bestimmung und Quantifizierung der Enzymaktivitäten innerhalb des linearen Messbereiches möglich ist. Typischerweise kann der Extraktionspuffer bestehen aus  
20 50 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM  $\epsilon$ -Aminocapronsäure, 10 % Glycerin, 5 mM KHCO<sub>3</sub>. Kurz vor der Extraktion wird 2 mM DTT und 0,5 mM PMSF zugegeben.

25 Die Aktivität der Geranyl-Diphosphat-Synthase (GPP-Synthase) kann in 50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 1 mM ATP, 0.2 % Tween-20, 5  $\mu$ M (<sup>14</sup>C)IPP und 50  $\mu$ M DMAPP (Dimethylallylpyrophosphat) nach Zugabe von Pflanzenextrakt bestimmt werden (nach Bouvier, Suire, d'Harlingue, Backhaus und Camara:  
30 Molecular cloning of geranyl diphosphate synthase and compartmentation of monoterpene synthesis in plant cells, Plant Journal 24 (2000,) 241-252). Nach der Inkubation von z.B. 2 Stunden bei 37°C werden die Reaktionsprodukte dephosphoryliert (nach Koyama, Fuji und Ogura: Enzymatic hydrolysis of polyprenyl pyrophosphates,  
35 Methods Enzymol. 110 (1985), 153-155) und mittels Dünnschichtchromatographie und Messung der inkorporierten Radioaktivität analysiert (Dogbo, Bardat, Quennemet und Camara: Metabolism of plastid terpenoids: In vitro inhibition of phytoene synthesis by phenethyl pyrophosphate derivatives, FEBS Letters 219 (1987)  
40 211-215).

Unter Farnesyl-Diphosphat-Synthase -Aktivität wird die Enzymaktivität einer Farnesyl-Diphosphat-Synthase verstanden.

Unter einer Farnesyl-Diphosphat-Synthase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Dimethylallyl-Diphosphate und Isopentenyl-Diphosphat in Farnesyl-Diphosphat umzuwandeln.

5

Dementsprechend wird unter Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Farnesyl-Diphosphat-Synthase umgesetzte Menge Dimethylallyl-Diphosphate und/oder Isopentenyl-Diphosphat bzw. gebildete Menge Farnesyl-Diphosphat  
10 verstanden.

Bei einer erhöhten Farnesyl-Diphosphat-Synthase -Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Farnesyl-Diphosphat-Synthase die  
15 umgesetzte Menge Dimethylallyl-Diphosphate und/oder Isopentenyl-Diphosphat bzw. die gebildete Menge Farnesyl-Diphosphat erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Farnesyl-Diphosphat-Synthase -Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens  
20 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität des Wildtyps.

25 Die Bestimmung der Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

30 Eingefrorenes Pflanzenmaterial wird durch intensives Mösern in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit Extraktionspuffer in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 extrahiert. Das jeweilige Verhältnis richtet sich nach den Enzymaktivitäten in dem verfügbaren Pflanzenmaterial, sodaß eine Bestimmung und Quantifizierung  
35 der Enzymaktivitäten innerhalb des linearen Messbereiches möglich ist. Typischerweise kann der Extraktionspuffer bestehen aus 50 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM ε-Aminocapronsäure, 10 % Glyzerin, 5 mM KHCO<sub>3</sub>. Kurz vor der Extraktion wird 2 mM DTT und  
40 0,5 mM PMSF zugegeben.

Die Aktivität der Farnesylpyrophosphat-Synthase (FPP-Synthase) kann nach einer Vorschrift von Joly und Edwards (Journal of Biological Chemistry 268 (1993), 26983-26989) bestimmt werden. Da-  
45 nach wird die Enzymaktivität in einem Puffer aus 10 mM HEPES (pH 7,2), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM Dithiothreitol, 20 µM Geranylpyrophosphat und 40 µM (1-<sup>14</sup>C) Isopentenylpyrophosphat (4 Ci/mmol) gemessen.

Die Reaktionsmischung wird bei 37°C inkubiert; die Reaktion wird durch Zugabe von 2,5 N HCl (in 70 % Ethanol mit 19 µg/ml Farnesol) gestoppt. Die Reaktionsprodukte werden somit durch Säurehydrolyse bei 37°C innerhalb von 30 Minuten hydrolysiert. Durch  
 5 Zugabe von 10% NaOH wird die Mischung neutralisiert und mit Hexan ausgeschüttelt. Ein Aliquot der Hexanphase kann zur Bestimmung der eingebauten Radioaktivität mittels Szintillationszähler gemessen werden.

- 10 Alternativ können nach Inkubation von Pflanzenextrakt und radioaktiv markierten IPP die Reaktionsprodukte mittels Dünnschichtchromatographie (Silica-Gel SE60, Merck) in Benzol/Methanol (9:1) getrennt werden. Radioaktiv markierte Produkte werden eluiert und die Radioaktivität bestimmt (nach Gaffe, Bru, Causse, Vidal,  
 15 Stamitti-Bert, Carde und Gallusci: LEFSP1, a tomato farnesyl pyrophosphate gene highly expressed during early fruit development; Plant Physiology 123 (2000) 1351-1362).

Unter Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase -Aktivität wird die  
 20 Enzymaktivität einer Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase verstanden.

Unter einer Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Farnesyl-Di-  
 25 phosphat und Isopentenyl-Diphosphat in Geranyl-Geranyl-Diphosphat umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Geranyl-  
 30 Geranyl-Diphosphat-Synthase umgesetzte Menge Farnesyl-Diphosphat und/oder Isopentenyl-Diphosphat bzw. gebildete Menge Geranyl-Geranyl-Diphosphat verstanden.

Bei einer erhöhten Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase -Aktivität  
 35 gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase die umgesetzte Menge Farnesyl-Diphosphat und/oder Isopentenyl-Diphosphat bzw. die gebildete Menge Geranyl-Geranyl-Diphosphat erhöht.

40

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase -Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter  
 45 mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Geranyl-Geranyl-Piphosphat-Synthase-Aktivität des Wildtyps.

## 51

Die Bestimmung der Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase -Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

- 5 Eingefrorenes Pflanzenmaterial wird durch intensives Mösern in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit Extraktionspuffer in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 extrahiert. Das jeweilige Verhältnis richtet sich nach den Enzymaktivitäten in dem verfügbaren Pflanzenmaterial, sodaß eine Bestimmung und Quantifizierung der Enzymaktivitäten innerhalb des linearen Messbereiches möglich ist. Typischerweise kann der Extraktionspuffer bestehen aus 10 50 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM  $\epsilon$ -Aminocapronsäure, 10 % Glycerin, 5 mM KHCO<sub>3</sub>. Kurz vor der Extraktion wird 2 mM DTT und 15 0,5 mM PMSF zugegeben.

- Aktivitätsmessungen der Geranylgeranylpyrophosphat-Synthase (GGPP-Synthase) können nach der von Dogbo und Camara beschriebenen Methode (in Biochim. Biophys. Acta 920 (1987), 140-148: Purification of isopentenyl pyrophosphate isomerase and geranylgeranyl pyrophosphate synthase from Capsicum chromoplasts by affinity chromatography) bestimmt werden. Dazu wird einem Puffer (50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 2 mM Dithiothreitol, 25 (1-<sup>14</sup>C)IPP (0,1  $\mu$ Ci, 10  $\mu$ M), 15  $\mu$ M DMAPP, GPP oder FPP) mit einem Gesamtvolumen von etwa 200  $\mu$ l Pflanzenextrakt zugesetzt. Die Inkubation kann für 1-2 Stunden (oder länger) bei 30°C erfolgen. Die Reaktion wird durch Zugabe von 0,5 ml Ethanol und 0,1 ml 6N HCl. Nach 10minütiger Inkubation bei 37°C wird die Reaktionsmischung mit 6N NaOH neutralisiert, mit 1 ml Wasser vermischt und mit 4 ml Diethylether ausgeschüttelt. In einem Aliquot (z.B. 0,2 mL) der Etherphase wird mittels Szintillationszählung die Menge an Radioaktivität bestimmt. Alternativ können nach Säurehydrolyse die radioaktiv markierten Prenylalkohole in Ether ausgeschüttelt werden und mit HPLC (25 cm-Säule Spherisorb ODS-1, 5 $\mu$ m; Elution mit Methanol/Wasser (90:10; v/v) bei einer Flussrate von 1 ml/min) getrennt und mittels Radioaktivitätsmonitor quantifiziert werden (nach Wiedemann, Misawa und Sandmann: Purification and enzymatic characterization of the geranylgeranyl pyrophosphate synthase from Erwinia uredovora after expression in 40 Escherichia coli;

Unter Phytoen-Synthase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Phytoen-Synthase verstanden.

Insbesondere wird unter einer Phytoen-Synthase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Geranyl-Geranyl-Diphosphat in Phytoen umzuwandeln.

5 Dementsprechend wird unter Phytoen-Synthase -Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Phytoen-Synthase umgesetzte Menge Geranyl-Geranyl-Diphosphat bzw. gebildete Menge Phytoen verstanden.

10 Bei einer erhöhten Phytoen-Synthase -Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Phytoen-Synthase die umgesetzte Menge Geranyl-Geranyl-Diphosphat bzw. die gebildete Menge Phytoen erhöht.

15 Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Phytoen-Synthase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Phytoen-Synthase-Aktivität des Wildtyps.

Die Bestimmung der Phytoen-Synthase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

25 Eingefrorenes Pflanzenmaterial wird durch intensives Mösern in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit Extraktionspuffer in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 extrahiert. Das jeweilige Verhältnis richtet sich nach den Enzymaktivitäten in dem verfügbaren Pflanzenmaterial, sodaß eine Bestimmung und Quantifizierung der Enzymaktivitäten innerhalb des linearen Messbereiches möglich ist. Typischerweise kann der Extraktionspuffer bestehen aus 50 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM  $\epsilon$ -Aminocapronsäure, 10 % Glycerin, 5 mM KHCO<sub>3</sub>. Kurz vor der Extraktion wird 2 mM DTT und 0,5 mM PMSF zugegeben.

Aktivitätsbestimmungen der Phytoen-Synthase (PSY) können nach der 40 von Fraser und Kollegen vorgestellten Methode (Fraser, Romer, Shipton, Mills, Kiano, Misawa, Drake, Schuch und Bramley: Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 (2002), 1092-1097, basierend auf Fraser, Pinto, Holloway 45 und Bramley, Plant Journal 24 (2000) 551-558) durchgeführt werden. Für Enzymmessungen werden Inkubationen mit (<sup>3</sup>H)Geranylgeranyl-pyrophosphat (15 mCi/mM, American Radiolabeled Chemicals,

St. Louis) als Substrat in 0.4 M Tris-HCl (pH 8,0) mit 1 mM DTT, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 6 mM Mn Cl<sub>2</sub>, 3 mM ATP, 0,1 % Tween 60, 1 mM Kaliumfluorid durchgeführt. Pflanzenextrakte werden mit Puffer gemischt, z B. 295 µl Puffer mit Extrakt in einem Gesamtvolumen von 500 µl. Inkubiert wird für wenigstens 5 Stunden bei 28°C. Anschließend wird Phytoene durch zweimaliges Ausschütteln (jeweils 500 µl) mit Chloroform extrahiert. Das während der Reaktion gebildete radioaktiv markierte Phytoene wird mittels Dünnschichtchromatographie auf Silicaplatten in Methanol/Wasser (95:5; v/v) getrennt. Phytoene kann in einer Jod-angereicherten Atmosphäre (durch Erhitzen weniger Iodkristalle) auf den Silicaplatten identifiziert werden. Ein Phytoene-Standard dient als Referenz. Die Menge an radioaktiv markiertem Produkt wird mittels Messung im Szintillationszähler bestimmt. Alternativ kann Phytoene auch mittels HPLC, die mit einem Radioaktivitätsdetektor versehen ist, quantifiziert werden (Fraser, Albrecht und Sandmann: Development of high performance liquid chromatographic systems for the separation of radiolabeled carotenes and precursors formed in specific enzymatic reactions; J. Chromatogr. 645 (1993) 265-272).

Unter Phytoen-Desaturase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Phytoen-Desaturase verstanden.

Unter einer Phytoen-Desaturase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Phytoen in Phytofluen und/oder Phytofluen in ζ-Carotin (Zetacarotin) umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Phytoen-Desaturase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Phytoen-Desaturase umgesetzte Menge Phytoen bzw. Phytofluen bzw. gebildete Menge Phytofluen bzw. ζ-Carotin verstanden.

Bei einer erhöhten Phytoen-Desaturase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Phytoen-Desaturase die umgesetzte Menge Phytoen bzw. Phytofluen bzw. die gebildete Menge Phytofluen bzw. ζ-Carotin erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Phytoen-Desaturase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Phytoen-Desaturase-Aktivität des Wildtyps.

Die Bestimmung der Phytoen-Desaturase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

- 5 Eingefrorenes Pflanzenmaterial wird durch intensives Mösern in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit Extraktionspuffer in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 extrahiert. Das jeweilige Verhältnis richtet sich nach den Enzymaktivitäten in dem verfügbaren Pflanzenmaterial, sodaß eine Bestimmung und Quantifizierung
- 10 der Enzymaktivitäten innerhalb des linearen Messbereiches möglich ist. Typischerweise kann der Extraktionspuffer bestehen aus 50 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM  $\epsilon$ -Aminocapronsäure, 10 % Glyzerin, 5 mM KHCO<sub>3</sub>. Kurz vor der Extraktion wird 2 mM DTT und
- 15 0,5 mM PMSF zugegeben.

- Die Aktivität der Phytoen-Desaturase (PDS) kann durch die Inkorporation von radioaktiv markiertem (<sup>14</sup>C)-Phytoen in ungesättigte Carotine gemessen werden (nach Römer, Fraser, Kiano, Shipton,
- 20 Misawa, Schuch und Bramley: Elevation of the provitamin A content of transgenic tomato plants; Nature Biotechnology 18 (2000) 666-669). Radioaktiv markiertes Phytoene kann synthetisiert werden nach Fraser (Fraser, De la Rivas, Mackenzie, Bramley: Phycomyces blakesleanus CarB mutants: their use in assays of phytoene
  - 25 desaturase; Phytochemistry 30 (1991), 3971-3976). Membranen von Plastiden des Zielgewebes können mit 100 mM MES-Puffer (pH 6,0) mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 mM Dithiothreitol in einem Gesamtvolumen von 1 mL inkubiert werden. In Aceton gelöstes (<sup>14</sup>C)-Phytoen (etwa 100.000 Zerfälle/Minute für jeweils eine Inkubation) wird zuge-
  - 30 geben, wobei die Acetonkonzentration 5 % (v/v) nicht übersteigen sollte. Diese Mischung wird bei 28°C für etwa 6 bis 7 Stunden im Dunklen unter Schütteln inkubiert. Danach werden Pigmente dreimal mit etwa 5 mL Petrolether (mit 10 % Diethylether versetzt) extrahiert und mittels HPLC getrennt und quantifiziert.

- 35 Alternativ kann die Aktivität der Phytoen-Desaturase nach Fraser et al. (Fraser, Misawa, Linden, Yamano, Kobayashi und Sandmann: Expression in Escherichia coli, purification, and reactivation of the recombinant Erwinia uredovora phytoene desaturase, Journal of
- 40 Biological Chemistry 267 (1992), 19891-19895) gemessen werden.

Unter Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Zeta-Carotin-Desaturase verstanden.



Unter einer Zeta-Carotin-Desaturase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist,  $\zeta$ -Carotin in Neurosporin und/oder Neurosporin in Lycopin umzuwandeln.

- 5 Dementsprechend wird unter Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Zeta-Carotin-Desaturase umgesetzte Menge  $\zeta$ -Carotin oder Neurosporin bzw. gebildete Menge Neurosporin oder Lycopin verstanden.
- 10 Bei einer erhöhten Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Zeta-Carotin-Desaturase die umgesetzte Menge  $\zeta$ -Carotin oder Neurosporin bzw. die gebildete Menge Neurosporin oder Lycopin erhöht.
- 15 Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugt mindestens 300 %, noch bevorzugt mindestens 500 %, 20 insbesondere mindestens 600 % der Zeta-Carotin-Desaturase - Aktivität des Wildtyps.

- Die Bestimmung der Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- 25 bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

- Eingefrorenes Pflanzenmaterial wird durch intensives Mösern in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit Extraktionspuffer 30 in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:20 extrahiert. Das jeweilige Verhältnis richtet sich nach den Enzymaktivitäten in dem verfügbaren Pflanzenmaterial, sodaß eine Bestimmung und Quantifizierung der Enzymaktivitäten innerhalb des linearen Messbereiches möglich ist. Typischerweise kann der Extraktionspuffer bestehen aus 35 50 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM  $\epsilon$ -Aminocapronsäure, 10 % Glyzerin, 5 mM KHCO<sub>3</sub>. Kurz vor der Extraktion wird 2 mM DTT und 0,5 mM PMSF zugegeben.
- 40 Analysen zur Bestimmung der  $\xi$ -Carotin-Desaturase (ZDS-Desaturase) können in 0.2 M Kaliumphosphat (pH 7.8, Puffervolumen von etwa 1 ml) durchgeführt werden. Die Analysemethode dazu wurde von Breitenbach und Kollegen (Breitenbach, Kuntz, Takaichi und Sandmann: Catalytic properties of an expressed and purified higher plant 45 type  $\xi$ -carotene desaturase from Capsicum annuum; European Journal of Biochemistry. 265(1):376-383, 1999 Oct ) publiziert. Jeder Analyseansatz enthält 3 mg Phosphatidylcholin, das in 0,4 M Kali-

## 56

umphosphatpuffer (pH 7,8) suspendiert ist, 5 µg ξ-Carotin oder Neurosporene, 0,02 % Butylhydroxytoluol, 10 µl Decyl-Plastochinon (1 mM methanolische Stammlösung) und Pflanzenextrakt. Das Volumen des Pflanzenextraktes muß der Menge an vorhandener ZDS-Desaturase-Aktivität angepasst werden, um Quantifizierungen in einem linearen Messbereich zu ermöglichen. Inkubationen erfolgen typischerweise für etwa 17 Stunden bei kräftigem Schütteln (200 Umdrehungen/Minute) bei etwa 28°C im Dunklen. Carotinoide werden durch Zugabe von 4 ml Aceton bei 50°C für 10 Minuten unter Schütteln extrahiert. Aus dieser Mischung werden die Carotinoide in eine Petroletherphase (mit 10 % Diethylether) überführt. Die Dethylether/Petroletherphase wird unter Stickstoff evaporiert, die Carotinoide wieder in 20 µl gelöst und mittels HPLC getrennt und quantifiziert.

15

Unter crtISO -Aktivität wird die Enzymaktivität eines crtISO-Proteins verstanden.

Unter einem crtISO-Proteins wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, 7,9,7',9'-tetra-cis-Lycopin in all-trans-Lycopin umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter crtISO-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein crtISO umgesetzte Menge 7,9,7',9'-tetra-cis-Lycopin bzw. gebildete Menge all-trans-Lycopin verstanden.

Bei einer erhöhten crtISO-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das crtISO-Proteins die umgesetzte Menge 7,9,7',9'-tetra-cis-Lycopin bzw. die gebildete Menge all-trans-Lycopin erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der crtISO-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der crtISO-Aktivität des Wildtyps.

Unter FtsZ-Aktivität wird die physiologische Aktivität eines FtsZ-Proteins verstanden.

Unter einem FtsZ-Protein wird ein Protein verstanden, das eine Zellteilungs und Plastidenteilungs-fördernde Wirkung hat und Homologien zu Tubulinproteinen aufweist.

45

Unter MinD -Aktivität wird die physiologische Aktivität eines MinD -Proteins verstanden.

Unter einem MinD -Protein wird ein Protein verstanden, das eine multifunktionale Rolle bei der Zellteilung aufweist. Es ist eine Membran-assoziierte ATPase und kann innerhalb der Zelle eine oszillierende Bewegung von Pol zu Pol zeigen.

Weiterhin kann die Erhöhung der Aktivität von Enzymen des Nicht-Mevalonatweges zu einer weiteren Erhöhung des gewünschten Keto-carotenoid-Endproduktes führen. Beispiele hierfür sind die 4-Diphosphocytidyl-2-C-Methyl-D-Erythritol-Synthase, die 4-Diphosphocytidyl-2-C-Methyl-D-Erythritol-Kinase und die 2-C-Methyl-D-Erythritol-2,4-cyclodiphosphat-Synthase. Durch Änderungen der Genexpression der entsprechenden Gene kann die Aktivität der genannten Enzyme erhöht werden. Die veränderten Konzentrationen der relevanten Proteine können standardgemäß mittels Antikörpern und entsprechenden Blotting-techniken nachgewiesen werden. Die Erhöhung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und/oder (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität und/oder Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase-Aktivität und/oder Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität und/oder Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität und/oder Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität und/oder Phytoen-Synthase-Aktivität und/oder Phytoen-Desaturase-Aktivität und/oder Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität und/oder crtISO-Aktivität und/oder FtsZ-Aktivität und/oder MinD-Aktivität kann durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Expressions- und Proteinebene oder durch Erhöhung der Genexpression von Nukleinsäuren kodierend eine HMG-CoA-Reduktase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Phytoen-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Phytoen-Desaturase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Zeta-Carotin-Desaturase und/oder Nukleinsäuren kodierend ein crtISO-Protein und/oder Nukleinsäuren kodierend ein FtsZ-Protein

und/oder Nukleinsäuren kodierend ein MinD-Protein gegenüber dem Wildtyp.

- Die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäuren kodierend
- 5 eine HMG-CoA-Reduktase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase und/oder Nukleinsäuren kodierend
- 10 eine Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Phytoen-Synthase und/oder
- 15 Nukleinsäuren kodierend eine Phytoen-Desaturase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Zeta-Carotin-Desaturase und/oder Nukleinsäuren kodierend ein crtISO-Protein und/oder Nukleinsäuren kodierend ein FtsZ-Protein und/oder Nukleinsäuren kodierend ein MinD-Protein gegenüber dem Wildtyp kann ebenfalls durch
- 20 verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Induzierung des HMG-CoA-Reduktase-Gens und/oder (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Gens und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Gens und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Gens und/oder Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Iso-
- 25 merase-Gens und/oder Geranyl-Diphosphat-Synthase-Gens und/oder Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Gens und/oder Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Gens und/oder Phytoen-Synthase-Gens und/oder Phytoen-Desaturase-Gens und/oder Zeta-Carotin-Desaturase-Gens und/oder crtISO-Gens und/oder FtsZ-Gens und/oder MinD-Gens durch
- 30 Aktivatoren oder durch Einbringen von einer oder mehrerer Kopien des HMG-CoA-Reduktase-Gens und/oder (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Gens und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Gens und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Gens und/oder Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase-Gens
- 35 und/oder Geranyl-Diphosphat-Synthase-Gens und/oder Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Gens und/oder Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Gens und/oder Phytoen-Synthase-Gens und/oder Phytoen-Desaturase-Gens und/oder Zeta-Carotin-Desaturase-Gens und/oder crtISO-Gens und/oder FtsZ-Gens und/oder MinD-Gens, also durch
- 40 Einbringen mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine HMG-CoA-Reduktase und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase und/oder mindestens einer Nukleinsäure
- 45

kodierend eine Geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder mindestens  
 einer Nukleinsäure kodierend eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase  
 und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Geranyl-  
 geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder mindestens einer Nuklein-  
 5 säure kodierend eine Phytoen-Synthase und/oder mindestens einer  
 Nukleinsäure kodierend eine Phytoen-Desaturase und/oder min-  
 destens einer Nukleinsäure kodierend eine Zeta-Carotin-Desaturase  
 und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend ein crtISO-  
 Protein und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend ein  
 10 FtsZ-Protein und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend  
 ein MinD-Protein in die Pflanze.

Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend  
 eine HMG-CoA-Reduktase und/oder (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-  
 15 Diphosphat-Reduktase und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-  
 Synthase und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase  
 und/oder Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase und/oder Geranyl-  
 Diphosphat-Synthase und/oder Farnesyl-Diphosphat-Synthase  
 und/oder Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder Phytoen-  
 20 Synthase und/oder Phytoen-Desaturase und/oder Zeta-Carotin-  
 Desaturase und/oder ein crtISO-Protein und/oder FtsZ-Protein  
 und/oder MinD-Protein wird erfindungsgemäß auch die Manipulation  
 der Expression der Pflanzen eigenen, endogenen HMG-CoA-Reduktase  
 und/oder (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase  
 25 und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase und/oder 1-Deoxy-  
 D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase und/oder Isopentenyl-Di-  
 phosphat- $\Delta$ -Isomerase und/oder Geranyl-Diphosphat-Synthase  
 und/oder Farnesyl-Diphosphat-Synthase und/oder Geranyl-geranyl-  
 Diphosphat-Synthase und/oder Phytoen-Synthase und/oder Phytoen-  
 30 Desaturase und/oder Zeta-Carotin-Desaturase und/oder des  
 Pflanzen eigenen crtISO-Proteins und/oder FtsZ-Proteins und/oder  
 MinD-Proteins verstanden.

Dies kann beispielsweise durch Veränderung der entsprechenden  
 35 Promotor DNA-Sequenz erreicht werden. Eine solche Veränderung,  
 die eine erhöhte Expressionsrate des Gens zur Folge hat, kann  
 beispielsweise durch Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen  
 erfolgen.

40 In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der  
 Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine HMG-CoA-Reduktase  
 und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure  
 kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-  
 Reduktase und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nuk-  
 45 leinsäure kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase  
 und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure  
 kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase und/

oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Phytoen-Synthase und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Phytoen-Desaturase und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Zeta-Carotin-Desaturase und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend ein crtISO-Protein und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend ein FtsZ-Protein und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend ein MinD-Protein durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine HMG-CoA-Reduktase und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Phytoen-Synthase und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Phytoen-Desaturase und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend ein crtISO-Protein und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend ein FtsZ-Protein und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend ein MinD-Protein in die Pflanze.

40

Dazu kann prinzipiell jedes HMG-CoA-Reduktase-Gen bzw.

(E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Gen bzw.

1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Gen bzw. 1-Deoxy-D-Xylose-

5-Phosphat-Reduktoisomerase-Gen bzw. Isopentenyl-Diphosphat-

45  $\Delta$ -Isomerase-Gen bzw. Geranyl-Diphosphat-Synthase-Gen bzw.

Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Gen bzw. Geranyl-geranyl-Diphosphat-

Synthase-Gen bzw. Phytoen-Synthase-Gen bzw. Phytoen-Desaturase-

Gen bzw. Zeta-Carotin-Desaturase-Gen bzw. crtISO-Gen bzw. FtsZ-Gen bzw. MinD-Gen verwendet werden.

- Bei genomischen HMG-CoA-Reduktase-Sequenzen bzw. (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Sequenzen bzw. 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Sequenzen bzw. 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Sequenzen bzw. Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase-Sequenzen bzw. Geranyl-Diphosphat-Synthase-Sequenzen bzw. Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Sequenzen bzw.
- 10 Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Sequenzen bzw. Phytoen-Synthase-Sequenzen bzw. Phytoen-Desaturase-Sequenzen bzw. Zeta-Carotin-Desaturase-Sequenzen bzw. crtISO-Sequenzen bzw. FtsZ-Sequenzen bzw. MinD-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall das die Wirtspflanze nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden Proteine zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.
- 15
- 20 In den erfindungsgemäßen bevorzugten transgenen Pflanzen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres HMG-CoA-Reduktase-Gen und/oder (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Gen und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Gen und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Gen und/oder Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase-Gen und/oder Geranyl-Diphosphat-Synthase-Gen und/oder Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Gen und/oder Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Gen und/oder Phytoen-Synthase-Gen und/oder Phytoen-Desaturase-Gen und/oder Zeta-Carotin-Desaturase-Gen und/oder crtISO-Gen und/oder FtsZ-Gen und/oder MinD-Gen vor.
- 25
- 30
- 35 In dieser bevorzugten Ausführungsform weist die genetisch veränderte Pflanze beispielsweise mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine HMG-CoA-Reduktase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine HMG-CoA-Reduktase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase und/oder
- 40 mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase oder mindestens
- 45 zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase

- oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Geranyl-Diphosphat-Synthase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Phytoen-Synthase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Phytoen-Synthase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Phytoen-Desaturase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Phytoen-Desaturase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Zeta-Carotin-Desaturase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Zeta-Carotin-Desaturase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend ein crtISO-Protein oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend ein crtISO-Protein und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend ein FtsZ-Protein oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend ein FtsZ-Protein und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend ein MinD-Protein oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend ein MinD-Protein auf.

Beispiele für HMG-CoA-Reduktase-Gene sind:

- 30 Eine Nukleinsäure, kodierend eine HMG-CoA-Reduktase aus *Arabidopsis thaliana*, Accession NM\_106299; (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 99, Protein: SEQ ID NO: 100),

sowie weitere HMG-CoA-Reduktase -Gene aus anderen Organismen mit  
35 den folgenden Accession Nummern:

- P54961, P54870, P54868, P54869, O02734, P22791, P54873, P54871, P23228, P13704, P54872, Q01581, P17425, P54874, P54839, P14891, P34135, O64966, P29057, P48019, P48020, P12683, P43256, Q9XEL8,  
40 P34136, O64967, P29058, P48022, Q41437, P12684, Q00583, Q9XHL5, Q41438, Q9YAS4, O76819, O28538, Q9Y7D2, P54960, O51628, P48021, Q03163, P00347, P14773, Q12577, Q59468, P04035, O24594, P09610, Q58116, O26662, Q01237, Q01559, Q12649, O74164, O59469, P51639, Q10283, O08424, P20715, P13703, P13702, Q96UG4, Q8SQZ9, O15888,  
45 Q9TUM4, P93514, Q39628, P93081, P93080, Q944T9, Q40148, Q84MM0, Q84LS3, Q9Z9N4, Q9KLM0



## 63

Beispiele für (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Gene sind:

Eine Nukleinsäure, kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase aus *Arabidopsis thaliana* (lytB/ISPH),  
 5 ACCESSION AY168881, (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 101, Protein: SEQ ID NO:102),

sowie weitere (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase -Gene aus anderen Organismen mit den folgenden Accession Nummern:

T04781, AF270978\_1, NP\_485028.1, NP\_442089.1, NP\_681832.1,  
 ZP\_00110421.1, ZP\_00071594.1, ZP\_00114706.1, ISPH\_SYNY3,  
 15 ZP\_00114087.1, ZP\_00104269.1, AF398145\_1, AF398146\_1, AAD55762.1,  
 AF514843\_1, NP\_622970.1, NP\_348471.1, NP\_562001.1, NP\_223698.1,  
 NP\_781941.1, ZP\_00080042.1, NP\_859669.1, NP\_214191.1,  
 ZP\_00086191.1, ISPH\_VIBCH, NP\_230334.1, NP\_742768.1, NP\_302306.1,  
 ISPH\_MYCLE, NP\_602581.1, ZP\_00026966.1, NP\_520563.1, NP\_253247.1,  
 20 NP\_282047.1, ZP\_00038210.1, ZP\_00064913.1, CAA61555.1,  
 ZP\_00125365.1, ISPH\_ACICA, EAA24703.1, ZP\_00013067.1,  
 ZP\_00029164.1, NP\_790656.1, NP\_217899.1, NP\_641592.1,  
 NP\_636532.1, NP\_719076.1, NP\_660497.1, NP\_422155.1, NP\_715446.1,  
 ZP\_00090692.1, NP\_759496.1, ISPH\_BURPS, ZP\_00129657.1,  
 25 NP\_215626.1, NP\_335584.1, ZP\_00135016.1, NP\_789585.1,  
 NP\_787770.1, NP\_769647.1, ZP\_00043336.1, NP\_242248.1,  
 ZP\_00008555.1, NP\_246603.1, ZP\_00030951.1, NP\_670994.1,  
 NP\_404120.1, NP\_540376.1, NP\_733653.1, NP\_697503.1, NP\_840730.1,  
 NP\_274828.1, NP\_796916.1, ZP\_00123390.1, NP\_824386.1,  
 30 NP\_737689.1, ZP\_00021222.1, NP\_757521.1, NP\_390395.1,  
 ZP\_00133322.1, CAD76178.1, NP\_600249.1, NP\_454660.1, NP\_712601.1,  
 NP\_385018.1, NP\_751989.1

Beispiele für 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase -Gene sind:

35 Eine Nukleinsäure, kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase aus *Lycopersicon esculentum*, ACCESSION #AF143812  
 (Nukleinsäure: SEQ ID NO:103 , Protein: SEQ ID NO: 104),

40 sowie weitere 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase -Gene aus anderen Organismen mit den folgenden Accession Nummern:  
 AF143812\_1, DXS\_CAPAN, CAD22530.1, AF182286\_1, NP\_193291.1,  
 T52289, AAC49368.1, AAP14353.1, D71420, DXS\_ORYSA, AF443590\_1,  
 BAB02345.1, CAA09804.2, NP\_850620.1, CAD22155.2, AAM65798.1,  
 45 NP\_566686.1, CAD22531.1, AAC33513.1, CAC08458.1, AAG10432.1,  
 T08140, AAP14354.1, AF428463\_1, ZP\_00010537.1, NP\_769291.1,  
 AAK59424.1, NP\_107784.1, NP\_697464.1, NP\_540415.1, NP\_196699.1,

- NP\_384986.1, ZP\_00096461.1, ZP\_00013656.1, NP\_353769.1,  
 BAA83576.1, ZP\_00005919.1, ZP\_00006273.1, NP\_420871.1,  
 AAM48660.1, DXS\_RHOCA, ZP\_00045608.1, ZP\_00031686.1, NP\_841218.1,  
 ZP\_00022174.1, ZP\_00086851.1, NP\_742690.1, NP\_520342.1,  
 5 ZP\_00082120.1, NP\_790545.1, ZP\_00125266.1, CAC17468.1,  
 NP\_252733.1, ZP\_00092466.1, NP\_439591.1, NP\_414954.1,  
 NP\_752465.1, NP\_622918.1, NP\_286162.1, NP\_836085.1, NP\_706308.1,  
 ZP\_00081148.1, NP\_797065.1, NP\_213598.1, NP\_245469.1,  
 ZP\_00075029.1, NP\_455016.1, NP\_230536.1, NP\_459417.1,  
 10 NP\_274863.1, NP\_283402.1, NP\_759318.1, NP\_406652.1, DXS\_SYNLE,  
 DXS\_SYNP7, NP\_440409.1, ZP\_00067331.1, ZP\_00122853.1,  
 NP\_717142.1, ZP\_00104889.1, NP\_243645.1, NP\_681412.1, DXS\_SYNEL,  
 NP\_637787.1, DXS\_CHLTE, ZP\_00129863.1, NP\_661241.1, DXS\_XANCP,  
 NP\_470738.1, NP\_484643.1, ZP\_00108360.1, NP\_833890.1,  
 15 NP\_846629.1, NP\_658213.1, NP\_642879.1, ZP\_00039479.1,  
 ZP\_00060584.1, ZP\_00041364.1, ZP\_00117779.1, NP\_299528.1  
 Beispiele für 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Gene  
 sind:
- 20 Eine Nukleinsäure, kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-  
 Reduktoisomerase aus *Arabidopsis thaliana*, ACCESSION #AF148852,  
 (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 105 , Protein: SEQ ID NO: 106),
- sowie weitere 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Gene  
 25 aus anderen Organismen mit den folgenden Accession Nummern:
- AF148852, AY084775, AY054682, AY050802, AY045634, AY081453,  
 AY091405, AY098952, AJ242588, AB009053, AY202991, NP\_201085.1,  
 T52570, AF331705\_1, BAB16915.1, AF367205\_1, AF250235\_1,  
 30 CAC03581.1, CAD22156.1, AF182287\_1, DXR\_MENPI, ZP\_00071219.1,  
 NP\_488391.1, ZP\_00111307.1, DXR\_SYNLE, AAP56260.1, NP\_681831.1,  
 NP\_442113.1, ZP\_00115071.1, ZP\_00105106.1, ZP\_00113484.1,  
 NP\_833540.1, NP\_657789.1, NP\_661031.1, DXR\_BACHD, NP\_833080.1,  
 NP\_845693.1, NP\_562610.1, NP\_623020.1, NP\_810915.1, NP\_243287.1,  
 35 ZP\_00118743.1, NP\_464842.1, NP\_470690.1, ZP\_00082201.1,  
 NP\_781898.1, ZP\_00123667.1, NP\_348420.1, NP\_604221.1,  
 ZP\_00053349.1, ZP\_00064941.1, NP\_246927.1, NP\_389537.1,  
 ZP\_00102576.1, NP\_519531.1, AF124757\_19, DXR\_ZYMMO, NP\_713472.1,  
 NP\_459225.1, NP\_454827.1, ZP\_00045738.1, NP\_743754.1, DXR\_PSEPK,  
 40 ZP\_00130352.1, NP\_702530.1, NP\_841744.1, NP\_438967.1, AF514841\_1,  
 NP\_706118.1, ZP\_00125845.1, NP\_404661.1, NP\_285867.1,  
 NP\_240064.1, NP\_414715.1, ZP\_00094058.1, NP\_791365.1,  
 ZP\_00012448.1, ZP\_00015132.1, ZP\_00091545.1, NP\_629822.1,  
 NP\_771495.1, NP\_798691.1, NP\_231885.1, NP\_252340.1,  
 45 ZP\_00022353.1, NP\_355549.1, NP\_420724.1, ZP\_00085169.1,  
 EAA17616.1, NP\_273242.1, NP\_219574.1, NP\_387094.1, NP\_296721.1,  
 ZP\_00004209.1, NP\_823739.1, NP\_282934.1, BAA77848.1, NP\_660577.1,

65

NP\_760741.1, NP\_641750.1, NP\_636741.1, NP\_829309.1, NP\_298338.1,  
NP\_444964.1, NP\_717246.1, NP\_224545.1, ZP\_00038451.1, DXR\_KITGR,  
NP\_778563.1.

5 Beispiele für Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase-Gene sind:

Eine Nukleinsäure, kodierend eine Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase aus *Adonis palaestina* clone ApIPI28, (ipiAa1), ACCESSION #AF188060, veröffentlicht durch Cunningham, F.X. Jr. and Gantt, E.:

10 Identification of multi-gene families encoding isopentenyl diphosphate isomerase in plants by heterologous complementation in *Escherichia coli*, *Plant Cell Physiol.* 41 (1), 119-123 (2000) (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 107, Protein: SEQ ID NO: 108),

15 sowie weitere Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase-Gene aus anderen Organismen mit den folgenden Accession Nummern:

Q38929, O48964, Q39472, Q13907, O35586, P58044, O42641, O35760,  
Q10132, P15496, Q9YB30, Q8YNH4, Q42553, O27997, P50740, O51627,  
20 O48965, Q8KFR5, Q39471, Q39664, Q9RVE2, Q01335, Q9HHE4, Q9BXS1,  
Q9KWF6, Q9CIF5, Q88WB6, Q92BX2, Q8Y7A5, Q8TT35, Q9KK75, Q8NN99,  
Q8XD58, Q8FE75, Q46822, Q9HP40, P72002, P26173, Q9Z5D3, Q8Z3X9,  
Q8ZM82, Q9X7Q6, O13504, Q9HFW8, Q8N9L9, Q9UUQ1, Q9NH02, Q9M6K9,  
Q9M6K5, Q9FXR6, O81691, Q9S7C4, Q8S3L8, Q9M592, Q9M6K3, Q9M6K7,  
25 Q9FV48, Q9LLB6, Q9AVJ1, Q9AVG8, Q9M6K6, Q9AVJ5, Q9M6K2, Q9AYS5,  
Q9M6K8, Q9AVG7, Q8S3L7, Q8W250, Q94IE1, Q9AVI8, Q9AYS6, Q9SAY0,  
Q9M6K4, Q8GVZ0, Q84RZ8, Q8KZ12, Q8KZ66, Q8FND7, Q88QC9, Q8BFZ6,  
BAC26382, CAD94476.

30 Beispiele für Geranyl-Diphosphat-Synthase -Gene sind:

Eine Nukleinsäure, kodierend eine Geranyl-Diphosphat-Synthase aus *Arabidopsis thaliana*, ACCESSION #Y17376, Bouvier, F., Suire, C., d'Harlingue, A., Backhaus, R.A. and Camara, B.; Molecular cloning

35 of geranyl diphosphate synthase and compartmentation of monoterpene synthesis in plant cells, *Plant J.* 24 (2), 241-252 (2000) (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 109, Protein: SEQ ID NO: 110),

sowie weitere Geranyl-Diphosphat-Synthase-Gene aus anderen

40 Organismen mit den folgenden Accession Nummern:

Q9FT89, Q8LKJ2, Q9FSW8, Q8LKJ3, Q9SBR3, Q9SBR4, Q9FET8, Q8LKJ1,  
Q84LG1, Q9JK86

Beispiele für Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Gene sind:

Eine Nukleinsäure, kodierend eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase aus *Arabidopsis thaliana* (FPS1), ACCESSION #U80605, veröffentlicht durch Cunillera, N., Arro, M., Delourme, D., Karst, F., Boron, A. und Ferrer, A.: *Arabidopsis thaliana* contains two differentially expressed farnesyl-diphosphate synthase genes, J. Biol. Chem. 271 (13), 7774-7780 (1996), (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 111, Protein: SEQ ID NO: 112),

10

sowie weitere Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Gene aus anderen Organismen mit den folgenden Accession Nummern:

P53799, P37268, Q02769, Q09152, P49351, O24241, Q43315, P49352, O24242, P49350, P08836, P14324, P49349, P08524, O66952, Q08291, P54383, Q45220, P57537, Q8K9A0, P22939, P45204, O66126, P55539, Q9SWH9, Q9AVI7, Q9FRX2, Q9AYS7, Q94IE8, Q9FXR9, Q9ZWF6, Q9FXR8, Q9AR37, O50009, Q94IE9, Q8RVK7, Q8RVQ7, O04882, Q93RA8, Q93RB0, Q93RB4, Q93RB5, Q93RB3, Q93RB1, Q93RB2, Q920E5.

20

Beispiele für Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase -Gene sind:

Eine Nukleinsäure, kodierend eine Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase aus *Sinaps alba*, ACCESSION #X98795, veröffentlicht durch Bonk, M., Hoffmann, B., Von Lintig, J., Schledz, M., Al-Babili, S., Hobeika, E., Kleinig, H. and Beyer, P.: Chloroplast import of four carotenoid biosynthetic enzymes in vitro reveals differential fates prior to membrane binding and oligomeric assembly, Eur. J. Biochem. 247 (3), 942-950 (1997), (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 113, Protein: SEQ ID NO: 114),

30

sowie weitere Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Gene aus anderen Organismen mit den folgenden Accession Nummern:

P22873, P34802, P56966, P80042, Q42698, Q92236, O95749, Q9WTN0, Q50727, P24322, P39464, Q9FXR3, Q9AYN2, Q9FXR2, Q9AVG6, Q9FRW4, Q9SXZ5, Q9AVJ7, Q9AYN1, Q9AVJ4, Q9FXR7, Q8LSC5, Q9AVJ6, Q8LSC4, Q9AVJ3, Q9SSU0, Q9SXZ6, Q9SST9, Q9AVJ0, Q9AVI9, Q9FRW3, Q9FXR5, Q94IF0, Q9FRX1, Q9K567, Q93RA9, Q93QX8, CAD95619, EAA31459

40

Beispiele für Phytoen-Synthase-Gene sind:

Eine Nukleinsäure, kodierend eine Phytoen-Synthase aus *Erwinia uredovora*, ACCESSION # D90087; veröffentlicht durch Misawa, N., Nakagawa, M., Kobayashi, K., Yamano, S., Izawa, Y., Nakamura, K. und Harashima, K.: Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products

45

expressed in *Escherichia coli*; J. Bacteriol. 172 (12), 6704-6712 (1990), (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 115, Protein: SEQ ID NO: 116),

sowie weitere Phytoen-Synthase -Gene aus anderen Organismen mit  
5 den folgenden Accession Nummern:

CAB39693, BAC69364, AAF10440, CAA45350, BAA20384, AAM72615,  
BAC09112, CAA48922, P\_001091, CAB84588, AAF41518, CAA48155,  
AAD38051, AAF33237, AAG10427, AAA34187, BAB73532, CAC19567,  
10 AAM62787, CAA55391, AAB65697, AAM45379, CAC27383, AAA32836,  
AAK07735, BAA84763, P\_000205, AAB60314, P\_001163, P\_000718,  
AAB71428, AAA34153, AAK07734, CAA42969, CAD76176, CAA68575,  
P\_000130, P\_001142, CAA47625, CAA85775, BAC14416, CAA79957,  
BAC76563, P\_000242, P\_000551, AAL02001, AAK15621, CAB94795,  
5 AAA91951, P\_000448

Beispiele für Phytoen-Desaturase-Gene sind:

Eine Nukleinsäure, kodierend eine Phytoen-Desaturase aus *Erwinia*  
20 *uredovora*, ACCESSION # D90087; veröffentlicht durch Misawa, N.,  
Nakagawa, M., Kobayashi, K., Yamano, S., Izawa, Y., Nakamura, K. und  
Harashima, K.: Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid  
biosynthetic pathway by functional analysis of gene products ex-  
pressed in *Escherichia coli*; J. Bacteriol. 172 (12), 6704-6712  
25 (1990), (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 117, Protein: SEQ ID NO: 118),

sowie weitere Phytoen-Desaturase -Gene aus anderen Organismen  
mit den folgenden Accession Nummern:

30 AAL15300, A39597, CAA42573, AAK51545, BAB08179, CAA48195,  
BAB82461, AAK92625, CAA55392, AAG10426, AAD02489, AAO24235,  
AAC12846, AAA99519, AAL38046, CAA60479, CAA75094, ZP\_001041,  
ZP\_001163, CAA39004, CAA44452, ZP\_001142, ZP\_000718, BAB82462,  
AAM45380, CAB56040, ZP\_001091, BAC09113, AAP79175, AAL80005,  
35 AAM72642, AAM72043, ZP\_000745, ZP\_001141, BAC07889, CAD55814,  
ZP\_001041, CAD27442, CAE00192, ZP\_001163, ZP\_000197, BAA18400,  
AAG10425, ZP\_001119, AAF13698, 2121278A, AAB35386, AAD02462,  
BAB68552, CAC85667, AAK51557, CAA12062, AAG51402, AAM63349,  
AAF85796, BAB74081, AAA91161, CAB56041, AAC48983, AAG14399,  
40 CAB65434, BAB73487, ZP\_001117, ZP\_000448, CAB39695, CAD76175,  
BAC69363, BAA17934, ZP\_000171, AAF65586, ZP\_000748, BAC07074,  
ZP\_001133, CAA64853, BAB74484, ZP\_001156, AAF23289, AAG28703,  
AAP09348, AAM71569, BAB69140, ZP\_000130, AAF41516, AAG18866,  
CAD95940, NP\_656310, AAG10645, ZP\_000276, ZP\_000192, ZP\_000186,  
45 AAM94364, EAA31371, ZP\_000612, BAC75676, AAF65582

Beispiele für Zeta-Carotin-Desaturase-Gene sind:

Eine Nukleinsäure, kodierend eine Zeta-Carotin-Desaturase aus *Narcissus pseudonarcissus*, ACCESSION #AJ224683, veröffentlicht durch Al-Babili, S., Oelschlegel, J. and Beyer, P.: A cDNA encoding for beta carotene desaturase (Accession No. AJ224683) from *Narcissus pseudonarcissus* L.. (PGR98-103), *Plant Physiol.* 117, 719-719 (1998), (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 119, Protein: SEQ ID NO: 120),

10 sowie weitere Zeta-Carotin-Desaturase-Gene aus anderen Organismen mit den folgenden Accession Nummern:

Q9R6X4, Q38893, Q9SMJ3, Q9SE20, Q9ZTP4, O49901, P74306, Q9FV46, Q9RCT2, ZDS\_NARPS, BAB68552.1, CAC85667.1, AF372617\_1, ZDS\_TARER, CAD55814.1, CAD27442.1, 2121278A, ZDS\_CAPAN, ZDS\_LYCES, NP\_187138.1, AAM63349.1, ZDS\_ARATH, AAA91161.1, ZDS\_MAIZE, AAG14399.1, NP\_441720.1, NP\_486422.1, ZP\_00111920.1, CAB56041.1, ZP\_00074512.1, ZP\_00116357.1, NP\_681127.1, ZP\_00114185.1, ZP\_00104126.1, CAB65434.1, NP\_662300.1

20

Beispiele für crtISO-Gene sind:

Eine Nukleinsäure, kodierend eine crtISO aus *Lycopersicon esculentum*; ACCESSION #AF416727, veröffentlicht durch Isaacson, T., Ronen, G., Zamir, D. and Hirschberg, J.: Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of beta-carotene and xanthophylls in plants; *Plant Cell* 14 (2), 333-342 (2002), (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 121, Protein: SEQ ID NO: 122),

30

sowie weitere crtISO -Gene aus anderen Organismen mit den folgenden Accession Nummern:

AAM53952

35

Beispiele für FtsZ-Gene sind:

Eine Nukleinsäure, kodierend eine FtsZ aus *Tagetes erecta*, ACCESSION #AF251346, veröffentlicht durch Moehs, C.P., Tian, L., Osteryoung, K.W. and Dellapenna, D.: Analysis of carotenoid biosynthetic gene expression during marigold petal development *Plant Mol. Biol.* 45 (3), 281-293 (2001), (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 123, Protein: SEQ ID NO: 124),

45

sowie weitere FtsZ -Gene aus anderen Organismen mit den folgenden Accession Nummern:

- CAB89286.1, AF205858\_1, NP\_200339.1, CAB89287.1, CAB41987.1,  
 5 AAA82068.1, T06774, AF383876\_1, BAC57986.1, CAD22047.1,  
 BAB91150.1, ZP\_00072546.1, NP\_440816.1, T51092, NP\_683172.1,  
 BAA85116.1, NP\_487898.1, JC4289, BAA82871.1, NP\_781763.1,  
 BAC57987.1, ZP\_00111461.1, T51088, NP\_190843.1, ZP\_00060035.1,  
 NP\_846285.1, AAL07180.1, NP\_243424.1, NP\_833626.1, AAN04561.1,  
 10 AAN04557.1, CAD22048.1, T51089, NP\_692394.1, NP\_623237.1,  
 NP\_565839.1, T51090, CAA07676.1, NP\_113397.1, T51087, CAC44257.1,  
 E84778, ZP\_00105267.1, BAA82091.1, ZP\_00112790.1, BAA96782.1,  
 NP\_348319.1, NP\_471472.1, ZP\_00115870.1, NP\_465556.1,  
 NP\_389412.1, BAA82090.1, NP\_562681.1, AAM22891.1, NP\_371710.1,  
 5 NP\_764416.1, CAB95028.1, FTSZ\_STRGR, AF120117\_1, NP\_827300.1,  
 JE0282, NP\_626341.1, AAC45639.1, NP\_785689.1, NP\_336679.1,  
 NP\_738660.1, ZP\_00057764.1, AAC32265.1, NP\_814733.1, FTSZ\_MYCKA,  
 NP\_216666.1, CAA75616.1, NP\_301700.1, NP\_601357.1, ZP\_00046269.1,  
 CAA70158.1, ZP\_00037834.1, NP\_268026.1, FTSZ\_ENTHR, NP\_787643.1,  
 20 NP\_346105.1, AAC32264.1, JC5548, AAC95440.1, NP\_710793.1,  
 NP\_687509.1, NP\_269594.1, AAC32266.1, NP\_720988.1, NP\_657875.1,  
 ZP\_00094865.1, ZP\_00080499.1, ZP\_00043589.1, JC7087, NP\_660559.1,  
 AAC46069.1, AF179611\_14, AAC44223.1, NP\_404201.1.

25 Beispiele für MinD -Gene sind:

Eine Nukleinsäure, kodierend eine MinD aus *Tagetes erecta*,  
 ACCESSION #AF251019, veröffentlicht durch Moehs, C.P., Tian, L.,  
 Osteryoung, K.W. und Dellapenna, D.: Analysis of carotenoid bio-  
 30 synthetic gene expression during marigold petal development;  
 Plant Mol. Biol. 45 (3), 281-293 (2001), (Nukleinsäure: SEQ ID  
 NO: 125, Protein: SEQ ID NO: 126),

sowie weitere MinD -Gene mit den folgenden Accession Nummern:

- 35 NP\_197790.1, BAA90628.1, NP\_038435.1, NP\_045875.1, AAN33031.1,  
 NP\_050910.1, CAB53105.1, NP\_050687.1, NP\_682807.1, NP\_487496.1,  
 ZP\_00111708.1, ZP\_00071109.1, NP\_442592.1, NP\_603083.1,  
 NP\_782631.1, ZP\_00097367.1, ZP\_00104319.1, NP\_294476.1,  
 40 NP\_622555.1, NP\_563054.1, NP\_347881.1, ZP\_00113908.1,  
 NP\_834154.1, NP\_658480.1, ZP\_00059858.1, NP\_470915.1,  
 NP\_243893.1, NP\_465069.1, ZP\_00116155.1, NP\_390677.1,  
 NP\_692970.1, NP\_298610.1, NP\_207129.1, ZP\_00038874.1,  
 NP\_778791.1, NP\_223033.1, NP\_641561.1, NP\_636499.1,  
 45 ZP\_00088714.1, NP\_213595.1, NP\_743889.1, NP\_231594.1,  
 ZP\_00085067.1, NP\_797252.1, ZP\_00136593.1, NP\_251934.1,  
 NP\_405629.1, NP\_759144.1, ZP\_00102939.1, NP\_793645.1,

NP\_699517.1, NP\_460771.1, NP\_860754.1, NP\_456322.1, NP\_718163.1,  
 NP\_229666.1, NP\_357356.1, NP\_541904.1, NP\_287414.1, NP\_660660.1,  
 ZP\_00128273.1, NP\_103411.1, NP\_785789.1, NP\_715361.1, AF149810\_1,  
 NP\_841854.1, NP\_437893.1, ZP\_00022726.1, EAA24844.1,  
 5 ZP\_00029547.1, NP\_521484.1, NP\_240148.1, NP\_770852.1, AF345908\_2,  
 NP\_777923.1, ZP\_00048879.1, NP\_579340.1, NP\_143455.1,  
 NP\_126254.1, NP\_142573.1, NP\_613505.1, NP\_127112.1, NP\_712786.1,  
 NP\_578214.1, NP\_069530.1, NP\_247526.1, AAA85593.1, NP\_212403.1,  
 NP\_782258.1, ZP\_00058694.1, NP\_247137.1, NP\_219149.1,  
 10 NP\_276946.1, NP\_614522.1, ZP\_00019288.1, CAD78330.1

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als HMG-CoA-Reduktase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID

- 5 NO: 100 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der
- 20 Sequenz SEQ ID NO: 100, und die die enzymatische Eigenschaft einer HMG-CoA-Reduktase aufweisen.

Weitere Beispiele für HMG-CoA-Reduktasen und HMG-CoA-Reduktase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen,

- 25 deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der SEQ ID NO: 100 leicht auffinden.

- 30 Weitere Beispiele für HMG-CoA-Reduktasen und HMG-CoA-Reduktase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 99 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter
- 35 Weise leicht auffinden.

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die

- 40 Aminosäuresequenz der HMG-CoA-Reduktase der Sequenz SEQ ID NO: 100.

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code

- 45 erhältlich.



## 71

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

5 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 99 in den Organismus ein.

10 Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 102 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abge-

5 leitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 102, und die die enzymatische Eigenschaft einer (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Di-

20 phosphat-Reduktase aufweisen.

Weitere Beispiele für (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktasen und (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen

25 Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID NO: 102 leicht auffinden.

30 Weitere Beispiele für (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktasen und (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 101 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben,

35 durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-

40 Reduktase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase der Sequenz SEQ ID NO: 102.

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

- 5 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.
- 10 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 101 in den Organismus ein.

- Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als (1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 104 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise
- 20 mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 104, und die die enzymatische Eigenschaft einer (1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase aufweisen.

- 25 Weitere Beispiele für (1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthasen und (1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche
- 30 der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID NO: 104 leicht auffinden.

- Weitere Beispiele für (1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthasen und
- 35 (1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 103 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

- 40 In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der (1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der (1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase der Sequenz SEQ ID NO: 104.
- 45

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

- 5 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.
- 10 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 103 in den Organismus ein.

- 5 Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 106 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise
- 20 mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 106, und die die enzymatische Eigenschaft einer 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase aufweisen.
- 25 Weitere Beispiele für 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerasen und 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben,
- 30 durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID NO: 106 leicht auffinden.

- 35 Weitere Beispiele für 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerasen und 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 105 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise
- 40 leicht auffinden.

- In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine
- 45 kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase der Sequenz SEQ ID NO: 106.

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

5 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

10 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 105 in den Organismus ein.

5 Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als Isopentenyl-D-Isomerase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 108 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, 20 bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 108, und die die enzymatische Eigenschaft einer Isopentenyl-D-Isomerase aufweisen.

25 Weitere Beispiele für Isopentenyl-D-Isomerasen und Isopentenyl-D-Isomerase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus 30 Datenbanken mit der Seq ID NO: 108 leicht auffinden.

Weitere Beispiele für Isopentenyl-D-Isomerasen und Isopentenyl-D-Isomerase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 107 aus verschiedenen Organismen deren 35 genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur 40 Erhöhung der Isopentenyl-D-Isomerase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Isopentenyl-D-Isomerase der Sequenz SEQ ID NO: 108.

## 75

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

- 5 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.
- 10 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 107 in den Organismus ein.

- Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als Geranyl-Diphosphat-Synthase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 110 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %,
  - 20 bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 110, und die die enzymatische Eigenschaft einer Geranyl-Diphosphat-Synthase aufweisen.
- 25 Weitere Beispiele für Geranyl-Diphosphat-Synthasen und Geranyl-Diphosphat-Synthase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID NO: 110 leicht auf-
  - 30 finden.

- Weitere Beispiele für Geranyl-Diphosphat-Synthasen und Geranyl-Diphosphat-Synthase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise
  - 35 ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 109 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.
- 40 In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Geranyl-Diphosphat-Synthase der Sequenz SEQ ID NO: 110.

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

- 5 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.
- 10 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 109 in den Organismus ein.

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter

- 5 Ausführungsform als Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 112 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, 20 bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 112, und die die enzymatische Eigenschaft einer Farnesyl-Diphosphat-Synthase aufweisen.

- 25 Weitere Beispiele für Farnesyl-Diphosphat-Synthasen und Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID NO: 112 leicht auf-
- 30 finden.

Weitere Beispiele für Farnesyl-Diphosphat-Synthasen und Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise

- 35 ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 111 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

- 40 In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Farnesyl-Diphosphat-Synthase der Sequenz SEQ ID NO: 112.

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

- 5 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.
- 10 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 111 in den Organismus ein.

- Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 114 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise
- 20 mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 114, und die die enzymatische Eigenschaft einer Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase aufweisen.
- 25 Weitere Beispiele für Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthasen und Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche
- 30 der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID NO: 114 leicht auffinden.

- Weitere Beispiele für Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthasen und
- 35 Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 113 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

40

- In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Geranyl-geranyl-Diphosphat-
- 45 Synthase der Sequenz SEQ ID NO: 114.

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

- 5 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.
- 10 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 113 in den Organismus ein.

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als Phytoen-Synthase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 116 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, 20 bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 116, und die die enzymatische Eigenschaft einer Phytoen-Synthase aufweisen.

- 25 Weitere Beispiele für Phytoen-Synthasen und Phytoen-Synthase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken
- 30 mit der Seq ID NO: 116 leicht auffinden.

Weitere Beispiele für Phytoen-Synthasen und Phytoen-Synthase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 115 aus verschiedenen Organismen deren genomische 35 Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

- 40 In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Phytoen-Synthase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Phytoen-Synthase der Sequenz SEQ ID NO: 116.



Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

- 5 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.
- 10 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 115 in den Organismus ein.
- Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als Phytoen-Desaturase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 118 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %,
  - 20 bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 118, und die die enzymatische Eigenschaft einer Phytoen-Desaturase aufweisen.
  - 25 Weitere Beispiele für Phytoen-Desaturasen und Phytoen-Desaturase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken
    - 30 mit der Seq ID NO: 118 leicht auffinden.
    - Weitere Beispiele für Phytoen-Desaturasen und Phytoen-Desaturase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 117 aus verschiedenen Organismen deren
      - 35 genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.
  - In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden
    - 40 zur Erhöhung der Phytoen-Desaturase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Phytoen-Desaturase der Sequenz SEQ ID NO: 118.

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

- 5 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.
- 10 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 117 in den Organismus ein.

- Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als Zeta-Carotin-Desaturase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 120 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %,
  - 20 bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 120, und die die enzymatische Eigenschaft einer Zeta-Carotin-Desaturase aufweisen.

- 25 Weitere Beispiele für Zeta-Carotin-Desaturasen und Zeta-Carotin-Desaturase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen
  - 30 aus Datenbanken mit der SEQ ID NO: 120 leicht auffinden.

- Weitere Beispiele für Zeta-Carotin-Desaturasen und Zeta-Carotin-Desaturase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 119 aus verschiedenen Organismen deren
  - 35 genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

- In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur
  - 40 Erhöhung der Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Zeta-Carotin-Desaturase der Sequenz SEQ ID NO: 120.

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

- 5 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.
- 10 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 119 in den Organismus ein.

- Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als CrtISO-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 122 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 122, und die die enzymatische Eigenschaft einer CrtIso aufweisen.
- 20

- Weitere Beispiele für CrtISO und CrtISO-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID NO: 122 leicht auffinden.
- 25

30

- Weitere Beispiele für CrtISO und CrtISO-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 121 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.
- 35

- In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der CrtISO-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der CrtISO der Sequenz SEQ ID NO: 122.
- 40

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

5 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 121 in den Organismus ein.

10 Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als FtsZ-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 124 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von  
5 mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 124, und die die enzymatische Eigenschaft einer FtsZ aufweisen.

20 Weitere Beispiele für FtsZn und FtsZ-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rück-  
25 übersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der SEQ ID NO: 124 leicht auffinden.

Weitere Beispiele für FtsZn und FtsZ-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 123 aus ver-  
30 schiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden  
35 zur Erhöhung der FtsZ-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der FtsZ der Sequenz SEQ ID NO: 124

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rück-  
40 übersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die  
45 codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 123 in den Organismus ein.

- 5 Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als MinD-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 126 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von
- 10 mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 126, und die die enzymatische Eigenschaft einer MinD aufweisen.

- 5 Weitere Beispiele für MinDn und MinD-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten
- 20 Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID NO: 126 leicht auffinden.

- Weitere Beispiele für MinDn und MinD-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 125 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt
- 25 ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

- In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur
- 30 Erhöhung der MinD-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der MinD der Sequenz SEQ ID NO: 126.

- Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rück-
- 35 übersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

- Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die
- 40 codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

- In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 125 in den
- 45 Organismus ein.

Alle vorstehend erwähnten HMG-CoA-Reduktase-Gene, (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Gene, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Gene, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Gene, Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase-Gene, Geranyl-5 Diphosphat-Synthase-Gene, Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Gene, Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Gene, Phytoen-Synthase-Gene, Phytoen-Desaturase-Gene, Zeta-Carotin-Desaturase-Gene, crtISO-Gene, FtsZ-Gene oder MinD-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen 10 wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) 15 erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben. 20 ben.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens weisen die Pflanzen gegenüber dem Wildtyp zusätzlich eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase Aktivität auf.

25 Unter einer reduzierten Aktivität wird, wie vorstehend erwähnt, vorzugsweise die teilweise oder im wesentlichen vollständige, auf unterschiedliche zellbiologische Mechanismen beruhende Unterbindung oder Blockierung der Funktionalität eines Enzyms in einer 30 pflanzlichen Zelle, Pflanze oder einem davon abgeleiteten Teil, Gewebe, Organ, Zellen oder Samen verstanden.

Die Reduzierung einer Aktivität in Pflanzen gegenüber dem Wildtyp kann beispielsweise durch Reduzierung der Proteinmenge, oder der 35 mRNA-Menge in der Pflanze erfolgen. Dementsprechend kann eine gegenüber dem Wildtyp reduzierte Aktivität direkt bestimmt werden oder über die Bestimmung der Proteinmenge oder der mRNA-Menge der erfindungsgemäßen Pflanze im Vergleich zum Wildtyp erfolgen.

40 Eine Reduzierung einer Aktivität umfasst eine mengenmäßige Verringerung eines Proteins bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen des Proteins (d.h. fehlende Nachweisbarkeit der entsprechenden Aktivität oder fehlende immunologische Nachweisbarkeit des entsprechenden Proteins).

Unter endogener  $\beta$ -Hydroxylase -Aktivität wird die Enzymaktivität der endogenen, pflanzeigenen  $\beta$ -Hydroxylase verstanden.

Unter einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase wird eine endogene, pflanzen-  
 5 eigene Hydroxylase wie vorstehend beschrieben, verstanden. Ist beispielsweise *Tagetes erecta* die genetisch zu verändernde Zielpflanze, so wird unter der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase die  $\beta$ -Hydroxylase von *Tagetes erecta* verstanden.

10 Unter einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase wird demnach insbesondere ein pflanzeigenes Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist,  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter endogener  $\beta$ -Hydroxylase -Aktivität  
 15 die in einer bestimmten Zeit durch das Protein endogene  $\beta$ -Hydroxylase umgesetzte Menge  $\beta$ -Carotin bzw. gebildete Menge Zeaxanthin verstanden.

Bei einer reduzierten endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität gegen-  
 20 über dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit die durch das Protein endogene  $\beta$ -Hydroxylase umgesetzte Menge  $\beta$ -Carotin bzw. die gebildete Menge Zeaxanthin reduziert.

25 Vorzugsweise beträgt diese Reduzierung der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt 100 %. Besonders bevorzugt ist die endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität komplett ausgeschaltet.

30

Es wurde überraschenderweise gefunden, dass es bei Pflanzen die  
 mehrheitlich Carotinoide des  $\alpha$ -Carotin-Weges, wie beispielsweise Lutein, herstellen, wie beispielsweise Pflanzen der Gattung *Tagetes*, vorteilhaft ist, die Aktivität der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase zu reduzieren und gegebenenfalls die Aktivität einer hetero-  
 35 logen Hydroxylase zu erhöhen. Besonders bevorzugt werden dabei Hydroxylasen oder funktionelle Äquivalente davon verwendet, die aus Pflanzen stammen, die mehrheitlich Carotinoide des  $\beta$ -Carotin-Weges herstellen, wie beispielsweise die vorstehend beschriebene  
 40  $\beta$ -Hydroxylase aus Tomate (Nukleinsäure: SEQ ID No. 97, Protein: SEQ ID No. 98).

Die Bestimmung der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase Aktivität erfolgt wie vorstehend beschrieben analog zur Bestimmung der Hydroxylase-  
 45 Aktivität.

Vorzugsweise erfolgt die Reduzierung der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität in Pflanzen durch mindestens eines der nachfolgenden Verfahren:

- 5 a) Einbringen mindestens einer doppelsträngigen endogenen  $\beta$ -Hydroxylase Ribonukleinsäuresequenz, nachstehend auch endogene  $\beta$ -Hydroxylase-dsRNA genannt, oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten.
- 10 Umfasst sind solche Verfahren, bei denen die endogene  $\beta$ -Hydroxylase-dsRNA gegen ein endogenes  $\beta$ -Hydroxylase-Gen (also genomische DNA-Sequenzen wie die Promotorsequenz) oder ein endogenes  $\beta$ -Hydroxylase-Transkript (also mRNA-Sequenzen) gerichtet ist,
- 15 b) Einbringen mindestens einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase antisense-Ribonukleinsäuresequenz, nachstehend auch endogene  $\beta$ -Hydroxylase-antisenseRNA genannt, oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette. Umfasst sind solche Verfahren, bei denen die endogene  $\beta$ -Hydroxylase-antisenseRNA gegen ein endogenes  $\beta$ -Hydroxylase-Gen (also genomische DNA-Sequenzen) oder ein endogenes  $\beta$ -Hydroxylase-Gen-Transkript (also RNA-Sequenzen) gerichtet ist. Umfasst sind auch  $\alpha$ -anomere Nukleinsäuresequenzen,
- 20 c) Einbringen mindestens einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-antisenseRNA kombiniert mit einem Ribozym oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 30 d) Einbringen mindestens einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase sense-Ribonukleinsäuresequenz, nachstehend auch endogene  $\beta$ -Hydroxylase-senseRNA genannt, zur Induktion einer Kosuppression oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 35 e) Einbringen mindestens eines DNA- oder Protein-bindenden Faktors gegen ein endogenes  $\beta$ -Hydroxylase-Gen, -RNA oder -Protein oder einer dessen Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 40 f) Einbringen mindestens einer, den endogenen  $\beta$ -Hydroxylase RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 45 g) Einbringen mindestens eines Konstruktes zur Erzeugung eines Funktionsverlustes, wie beispielsweise die Generierung von Stopp-Kodons oder eine Verschiebungen im Leseraster,



an einem endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Gen beispielsweise durch Erzeugung einer Insertion, Deletion, Inversion oder Mutation in einem endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Gen. Bevorzugt können Knock-out-Mutanten mittels gezielter Insertion in besagtes endogenes  $\beta$ -Hydroxylase-Gen durch homologe Rekombination oder  
5 Einbringen von sequenzspezifischen Nukleasen gegen endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Gensequenzen generiert werden.

Dem Fachmann ist bekannt, dass auch weitere Verfahren im Rahmen  
10 der vorliegenden Erfindung zur Verminderung einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase bzw. seiner Aktivität oder Funktion eingesetzt werden können. Beispielsweise kann auch das Einbringen einer dominant-negativen Variante einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette vor-  
15 teilhaft sein. Dabei kann jedes einzelne dieser Verfahren eine Verminderung der Proteinmenge, mRNA-Menge und/oder Aktivität einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase bewirken. Auch eine kombinierte Anwendung ist denkbar. Weitere Methoden sind dem Fachmann bekannt und können die Behinderung oder Unterbindung der Prozessierung  
20 der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase, des Transports der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase oder dessen mRNA, Hemmung der Ribosomenanlagerung, Hemmung des RNA-Spleißens, Induktion eines endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-RNA abbauenden Enzyms und/oder Hemmung der Translationselongation oder -termination umfassen.

25 Die einzelnen bevorzugten Verfahren seien infolge durch beispielhafte Ausführungsformen beschrieben:

a) Einbringen einer doppelsträngigen, endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Ribonukleinsäuresequenz (endogene  $\beta$ -Hydroxylase-dsRNA)  
30

Das Verfahren der Genregulation mittels doppelsträngiger RNA wurde vorstehend für die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität ausführlich beschrieben. Analog lässt sich dieses Verfahren  
35 für die Reduzierung der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität durchführen.

Unter einer doppelsträngigen endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Ribonukleinsäuresequenz oder auch endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-dsRNA  
40 wird vorzugsweise ein RNA-Molekül verstanden, das einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen endogenen  
45  $\beta$ -Hydroxylase-Transkripts identisch ist und/oder

- b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Promotor-Sequenz identisch ist.

Im erfindungsgemäßen Verfahren bringt man daher zur Reduzierung  
5 der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität bevorzugt in die Pflanze eine RNA ein, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

- 10 a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Transkripts identisch ist und/oder

- b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Promotor-Sequenz identisch ist.

- 5 Unter dem Begriff „endogenes  $\beta$ -Hydroxylase-Transkript“ wird der transkribierte Teil eines endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Gens verstanden, der neben der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase kodierenden Sequenz beispielsweise auch nichtkodierende Sequenzen, wie beispielsweise auch UTRs enthält.

20

Unter einer RNA, die „mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Promotor-Sequenz identisch ist“, ist vorzugsweise gemeint, dass die RNA-Sequenz mit mindestens einem Teil des theoretischen Transkriptes der endogenen  $\beta$ -Hydroxy-  
25 lase-Promotor-Sequenz, also der entsprechenden RNA-Sequenz, identisch ist.

Unter „einem Teil“ des Pflanze eigenen endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Transkripts bzw. der Pflanze eigenen endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Pro-  
30 motor-Sequenz werden Teilsequenzen verstanden, die von wenigen Basenpaaren bis hin zu vollständigen Sequenzen des Transkripts bzw. der Promotorsequenz reichen können. Die optimale Länge der Teilsequenzen kann der Fachmann durch Routineversuche leicht ermitteln.

35

In der Regel beträgt die Länge der Teilsequenzen mindestens 10 Basen und höchstens 2 kb, bevorzugt mindestens 25 Basen und höchstens 1,5 kb, besonders bevorzugt mindestens 50 Basen und höchstens 600 Basen, ganz besonders bevorzugt mindestens  
40 100 Basen und höchstens 500, am meisten bevorzugt mindestens 200 Basen oder mindestens 300 Basen und höchstens 400 Basen.

Vorzugsweise werden die Teilsequenzen so ausgesucht, dass eine möglichst hohe Spezifität erreicht wird und nicht Aktivitäten  
45 anderer Enzyme reduziert werden, deren Verminderung nicht erwünscht ist. Es ist daher vorteilhaft für die Teilsequenzen der der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-dsRNA Teile des endogenen  $\beta$ -Hydroxy-

lase Transkripts und/oder Teilsequenzen der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Promotor-Sequenzen zu wählen, die nicht in anderen Aktivitäten auftreten.

- 5 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält daher die endogene  $\beta$ -Hydroxylase-dsRNA eine Sequenz, die mit einem Teil des Pflanze eigenen endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Transkripts identisch ist und das 5'-Ende oder das 3'-Ende der Pflanze eigenen Nukleinsäure, kodierend eine endogene  $\beta$ -Hydroxylase enthält. Insbesondere  
10 sind nichttranslatierte Bereiche im 5' oder 3' des Transkriptes geeignet, selektive Doppel-Strang-Strukturen herzustellen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung bezieht sich auf doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA-Moleküle), die bei Einbringen in  
15 einen pflanzlichen Organismus (oder eine davon abgeleitete Zelle, Gewebe, Organ oder Vermehrungsmaterial) die Verminderung einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase bewirken.

- Ferner betrifft die Erfindung ein doppelsträngiges RNA-Molekül  
20 zur Reduzierung der Expression einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase (endogene  $\beta$ -Hydroxylase-dsRNA) umfassend dabei bevorzugt

- a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil eines "sense"-RNA-endogene  $\beta$ -Hydroxylase-  
25 Transkriptes, und
- b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen, bevorzugt vollständig, komplementären ist.  
30

- Zur Transformation der Pflanze mit einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-dsRNA wird bevorzugt ein Nukleinsäurekonstrukt verwendet, das in die Pflanze eingebracht wird und das in der Pflanze in die endo-  
35 gene  $\beta$ -Hydroxylase-dsRNA transkribiert wird.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Nukleinsäurekonstrukt, transkribierbar in

- 40 a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-endogene  $\beta$ -Hydroxylase Transkriptes, und
- 45 b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-sense-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementär ist.

Diese Nukleinsäurekonstrukte werden im folgenden auch Expressionskassetten oder Expressionsvektoren genannt.

In Bezug auf die dsRNA-Moleküle wird unter der endogenen  
5  $\beta$ -Hydroxylase Nukleinsäuresequenz, bzw. das entsprechende Transkript bevorzugt die Sequenz gemäß SEQ ID NO: 127 oder ein Teil derselben verstanden.

"Im wesentlichen identisch" meint, dass die dsRNA Sequenz auch  
10 Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase Zielsequenz aufweisen kann und dennoch eine effizient Verminderung der Expression bewirkt. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 75 %, bevorzugt mindestens 80 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 90 % am meisten  
15 bevorzugt 100 % zwischen dem "sense"-Strang einer inhibitorischen dsRNA und mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes eines endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Gens, bzw. zwischen dem "antisense"-Strang dem komplementären Strang eines endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Gens.

20 Eine 100%ige Sequenzidentität zwischen dsRNA und einem endogenen  $\beta$ -Hydroxylase Gentranskript ist nicht zwingend erforderlich, um eine effiziente Verminderung der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase Expression zu bewirken. Demzufolge besteht der Vorteil, dass das  
25 Verfahren tolerant ist gegenüber Sequenzabweichungen, wie sie infolge genetischer Mutationen, Polymorphismen oder evolutionärer Divergenzen vorliegen können. So ist es beispielsweise möglich mit der dsRNA, die ausgehend von der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase Sequenz des einen Organismus generiert wurde, die endogene  
30  $\beta$ -Hydroxylase Expression in einem anderen Organismus zu unterdrücken. Zu diesem Zweck umfasst die dsRNA bevorzugt Sequenzbereiche von endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Gentranskripten, die konservierten Bereichen entsprechen. Besagte konservierte Bereiche können aus Sequenzvergleichen leicht abgeleitet werden.

35 Alternativ, kann eine "im wesentlichen identische" dsRNA auch als Nukleinsäuresequenz definiert werden, die befähigt ist, mit einem Teil eines endogenen  $\beta$ -Hydroxylase Gentranskriptes zu hybridisieren (z.B. in 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6,4, 1 mM EDTA bei  
40 50°C oder 70°C für 12 bis 16 h).

"Im wesentlichen komplementär" meint, dass der "antisense"-RNA-Strang auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu dem Komplement des "sense"-RNA-Stranges  
45 aufweisen kann. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 80 %, bevorzugt mindestens 90 %, ganz besonders bevorzugt mindestens

95 %, am meisten bevorzugt 100 % zwischen dem "antisense"-RNA-Strang und dem Komplement des "sense"-RNA-Stranges.

In einer weiteren Ausführungsform umfasst die endogene  $\beta$ -Hydroxylase-dsRNA

a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes des Promotorbereichs eines endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Gens, und

b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementären ist.

Das entsprechende, bevorzugt zur Transformation der Pflanzen zu verwendende, Nukleinsäurekonstrukt, umfasst

a) einen "sense"-DNA-Strang der im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des Promotorbereichs eines endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Gens, und

b) einen "antisense"-DNA-Strang, der zu dem DNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementär ist.

Zur Herstellung der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Sequenzen zur Reduzierung der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität werden, insbesondere für *Tagetes erecta*, besonders bevorzugt die folgenden Teil-Sequenzen verwendet:

SEQ ID NO: 163: Sense-Fragment der 5'terminalen Region der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase

SEQ ID NO: 164: Antisense-Fragment der 5'terminalen Region der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase

Die dsRNA kann aus einem oder mehr Strängen von Polyribonukleotiden bestehen. Natürlich können, um den gleichen Zweck zu erreichen, auch mehrere individuelle dsRNA Moleküle, die jeweils einen der oben definierten Ribonukleotidsequenzabschnitte umfassen, in die Zelle oder den Organismus eingebracht werden.

Die doppelsträngige dsRNA-Struktur kann ausgehend von zwei komplementären, separaten RNA-Strängen oder - bevorzugt - ausgehend von einem einzelnen, selbstkomplementären RNA-Strang gebildet werden. In diesem Fall sind "sense"-RNA-Strang und "anti-

sense"-RNA-Strang bevorzugt kovalent in Form eines invertierten "Repeats" miteinander verbunden.

Wie z.B. in WO 99/53050 beschrieben, kann die dsRNA auch eine Haarnadelstruktur umfassen, indem "sense"- und "antisense"-Strang durch eine verbindende Sequenz ("Linker"; beispielsweise ein Intron) verbunden werden. Die selbstkomplementären dsRNA-Strukturen sind bevorzugt, da sie lediglich die Expression einer RNA-Sequenz erfordern und die komplementären RNA-Stränge stets in einem äquimolaren Verhältnis umfassen. Bevorzugt ist die verbindende Sequenz ein Intron (z.B. ein Intron des ST-LS1 Gens aus Kartoffel; Vancanneyt GF et al. (1990) Mol Gen Genet 220(2):245-250).

Die Nukleinsäuresequenz kodierend für eine dsRNA kann weitere Elemente beinhalten, wie beispielsweise Transkriptionsterminationssignale oder Polyadenylierungssignale.

Weitere bevorzugte Ausführungsformen für die Reduzierung der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase Aktivität ergeben sich analog der vorstehend beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen der Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität unter Austausch der  $\epsilon$ -Cyclase durch endogene  $\beta$ -Hydroxylase.

Besonders bevorzugt werden im erfindungsgemäßen Verfahren genetisch veränderte Pflanzen mit folgende Kombinationen genetischer Veränderungen verwendet:

Genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität aufweisen,

5

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität aufweisen, sowie

10

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität aufweisen.

15

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität und eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität aufweisen,

20

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

25

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

30

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

35

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

40

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität aufweisen,

45 genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität und mindestens eine weitere

erhöhte Aktivität, ausgewählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität, Iso-  
 5 pentenyl-Diphosphat-D-Isomerase-Aktivität, Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Phytoen-Synthase-Aktivität, Phytoen-Desaturase-Aktivität, Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität, crtISO-Aktivität, FtsZ-Aktivität und MinD-Aktivität  
 10 aufweisen.

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-  
 15 Aktivität und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-  
 20 Aktivität und eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern,  
 25 eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität und eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern,  
 30 eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern,  
 35 eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität aufweisen.

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern,  
 40 eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine  
 45 erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte Hydroxylase-



Aktivität und eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und mindestens eine weitere erhöhte Aktivität, ausgewählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität, Isopentenyl-Diphosphat-D-Isomerase-Aktivität, Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Phytoen-Synthase-Aktivität, Phytoen-Desaturase-Aktivität, Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität, crtISO-Aktivität, FtsZ-Aktivität und MinD-Aktivität aufweisen.

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und mindestens eine weitere erhöhte Aktivität, ausgewählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität, Isopentenyl-Diphosphat-D-Isomerase-Aktivität, Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Phytoen-Synthase-Aktivität, Phytoen-Desatu-

rase-Aktivität, Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität, crtISO-Aktivität, FtsZ-Aktivität und MinD-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine  
 5 erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern,  
 eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine reduzierte endogene  
 b-Hydroxylase-Aktivität und mindestens eine weitere erhöhte  
 Aktivität, ausgewählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität,  
 (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität,  
 10 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose  
 -5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität, Isopentenyl-Diphosphat-D-  
 Isomerase-Aktivität, Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Far-  
 nesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Geranyl-Geranyl-Diphosphat-  
 Synthase-Aktivität, Phytoen-Synthase-Aktivität, Phytoen-Desa-  
 15 turase-Aktivität, Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität, crtISO-  
 Aktivität, FtsZ-Aktivität und MinD-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine  
 erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern,  
 20 eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte Hydroxylase-  
 Aktivität und mindestens eine weitere erhöhte Aktivität, ausge-  
 wählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, (E)-4-Hydroxy-  
 3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität, 1-Deoxy-D-  
 Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-  
 25 Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität, Isopentenyl-Diphosphat-  
 $\Delta$ -Isomerase-Aktivität, Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität,  
 Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Geranyl-Geranyl-Diphos-  
 phat-Synthase-Aktivität, Phytoen-Synthase-Aktivität, Phytoen-  
 Desaturase-Aktivität, Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität, crtISO-  
 30 Aktivität, FtsZ-Aktivität und MinD-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine  
 erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern,  
 eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität, eine reduzierte endogene  
 35  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität und mindestens eine weitere erhöhte  
 Aktivität, ausgewählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität,  
 (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität,  
 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität, 1-Deoxy-  
 D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität, Isopentenyl-  
 40 Diphosphat-D-Isomerase-Aktivität, Geranyl-Diphosphat-Synthase-  
 Aktivität, Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Geranyl-  
 Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Phytoen-Synthase-Aktivi-  
 tät, Phytoen-Desaturase-Aktivität, Zeta-Carotin-Desaturase-  
 Aktivität, crtISO-Aktivität, FtsZ-Aktivität und MinD-Aktivität  
 45 aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine reduzierte  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und mindestens eine weitere erhöhte Aktivität, ausgewählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität, Isopentenyl-Diphosphat-D-Isomerase-Aktivität, Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Phytoen-Synthase-Aktivität, Phytoen-Desaturase-Aktivität, Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität, crtISO-Aktivität, FtsZ-Aktivität und MinD-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität, eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität und mindestens eine weitere erhöhte Aktivität, ausgewählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität, Isopentenyl-Diphosphat-D-Isomerase-Aktivität, Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Phytoen-Synthase-Aktivität, Phytoen-Desaturase-Aktivität, Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität, crtISO-Aktivität, FtsZ-Aktivität und MinD-Aktivität aufweisen.

Besonders bevorzugte, genetisch veränderte Pflanzen, weisen im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität auf, wobei

die erhöhte Ketolase Aktivität dadurch verursacht wird, dass man Nukleinsäuren einbringt, die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäure-

ebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase aufweist,

die erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität dadurch verursacht wird, dass man Nukleinsäure einbringt, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 96 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 20 aufweist

10

und die erhöhte Hydroxylase-Aktivität dadurch verursacht wird, dass man Nukleinsäuren einbringt, kodierend eine Hydroxylase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 98 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von

15 Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 18 aufweist.

Besonders bevorzugte, genetisch veränderte Pflanzen, weisen im

20 Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern, eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität, eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität auf, wobei

25

die erhöhte Ketolase Aktivität dadurch verursacht wird, dass man Nukleinsäuren einbringt, die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete

30 Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase aufweist,

die erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität dadurch verursacht wird, dass man Nukleinsäure einbringt, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 96 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 20 aufweist,

40

die erhöhte Hydroxylase-Aktivität dadurch verursacht wird, dass man Nukleinsäuren einbringt, kodierend eine Hydroxylase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 98 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Amino-

45 säuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 18 aufweist, und die reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte endo-

gene  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität gemäß den vorstehend beschriebenen, bevorzugten Ausführungsformen verursacht wird.

Die Herstellung dieser genetisch veränderten Pflanzen kann, wie  
5 nachstehend beschrieben, beispielsweise durch Einbringen einzelner Nukleinsäurekonstrukte (Expressionskassetten) oder durch Einbringen von Mehrfachkonstrukten erfolgen, die bis zu zwei, drei oder vier der beschriebenen Aktivitäten enthalten.

10 Im erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden wird vorzugsweise dem Kultivierungsschritt der genetisch veränderten Pflanzen, im folgenden auch transgene Pflanzen bezeichnet, ein Ernten der Pflanzen und ein Isolieren von Ketocarotinoiden aus den Blütenblättern der Pflanzen angeschlossen.

15 Die transgenen Pflanzen werden in an sich bekannter Weise auf Nährböden gezogen und entsprechend geerntet.

Die Isolierung von Ketocarotinoiden aus den geernteten Blüten-  
20 blättern erfolgt in an sich bekannter Weise, beispielsweise durch Trocknung und anschließender Extraktion und gegebenenfalls weiterer chemischer oder physikalischer Reinigungsprozesse, wie beispielsweise Fällungsmethoden, Kristallographie, thermische Trennverfahren, wie Rektifizierverfahren oder physikalische  
25 Trennverfahren, wie beispielsweise Chromatographie. Die Isolierung von Ketocarotinoiden aus den Blütenblättern erfolgt beispielsweise bevorzugt durch organische Lösungsmittel wie Aceton, Hexan, Ether oder tert.-Methylbutylether.

30 Weitere Isolierverfahren von Ketocarotinoiden, insbesondere aus Blütenblättern, sind beispielsweise in Egger und Kleinig (Phytochemistry (1967) 6, 437-440) und Egger (Phytochemistry (1965) 4, 609-618) beschrieben.

35 Vorzugsweise sind die Ketocarotinoide ausgewählt aus der Gruppe Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin und Adonixanthin.

Ein besonders bevorzugtes Ketocarotinoid ist Astaxanthin.

40 Die Ketocarotinoide fallen im erfindungsgemäßen Verfahren in Blütenblättern in Form ihrer Mono- oder Diester mit Fettsäuren an. Einige nachgewiesene Fettsäuren sind z.B. Myristinsäure, Palmitinsäure, Stearinsäure, Ölsäure, Linolensäure, und Laurin-  
45 säure (Kamata und Simpson (1987) Comp. Biochem. Physiol. Vol. 86B(3), 587-591).

Im folgenden wird exemplarisch die Herstellung genetisch veränderter Pflanzen mit erhöhter oder verursachter Ketolase-Aktivität in Blütenblättern beschrieben. Die Erhöhung weiterer Aktivitäten, wie beispielsweise der Hydroxylase-Aktivität und/oder der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und/oder der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität und/oder der (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität und/oder der 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität und/oder der 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität und/oder der Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase-Aktivität und/oder der Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität und/oder der Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität und/oder der Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität und/oder der Phytoen-Synthase-Aktivität und/oder der Phytoen-Desaturase-Aktivität und/oder der Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität und/oder der crtISO-Aktivität und/oder der FtsZ-Aktivität und/oder der MinD-Aktivität kann analog unter Verwendung von Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Hydroxylase bzw.  $\beta$ -Cyclase bzw. Nukleinsäuren kodierend eine HMG-CoA-Reduktase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Phytoen-Synthase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Phytoen-Desaturase und/oder Nukleinsäuren kodierend eine Zeta-Carotin-Desaturase und/oder Nukleinsäuren kodierend ein crtIso-Protein und/oder Nukleinsäuren kodierend ein FtsZ-Protein und/oder Nukleinsäuren kodierend ein MinD-Protein anstelle von Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Ketolase erfolgen. Die Reduzierung weiterer Aktivitäten, wie beispielsweise die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität bzw. der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität kann analog unter Verwendung von anti- $\epsilon$ -Cyclase-Nukleinsäuresequenzen oder  $\epsilon$ -Cyclase-Inverted-Repeat-Nukleinsäuresequenz bzw. unter Verwendung von anti-endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Nukleinsäuresequenzen oder endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Inverted-Repeat-Nukleinsäuresequenzen anstelle von Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Ketolase erfolgen. Die Transformation kann bei den Kombinationen von genetischen Veränderungen einzeln oder durch Mehrfachkonstrukte erfolgen.

Die Herstellung der transgenen Pflanzen erfolgt vorzugsweise durch Transformation der Ausgangspflanzen, mit einem Nukleinsäurekonstrukt, das die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren kodierend eine Ketolase enthält, die mit einem oder mehreren

Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.

Diese Nukleinsäurekonstrukte, in denen die kodierende Nukleinsäuresequenz mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten, werden im folgenden auch Expressionskassetten genannt.

- 10 Die Erfindung betrifft weiterhin Nukleinsäurekonstrukte enthaltend mindestens eine Nukleinsäure kodierend eine Ketolase und zusätzlich mindestens eine weitere Nukleinsäure, ausgewählt aus der Gruppe
- a) Nukleinsäuren kodierend eine  $\beta$ -Cyclase,
  - 15 b) Nukleinsäuren kodierend eine  $\beta$ -Hydroxylase,
  - c) Nukleinsäuren kodierend eine HMG-CoA-Reduktase,
  - d) Nukleinsäuren kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase
  - e) Nukleinsäuren kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase, f) Nukleinsäuren kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase,
  - 20 g) Nukleinsäuren kodierend eine Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase,
  - h) Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Diphosphat-Synthase,
  - 25 i) Nukleinsäuren kodierend eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase,
  - j) Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase,
  - k) Nukleinsäuren kodierend eine Phytoen-Synthase,
  - l) Nukleinsäuren kodierend eine Phytoen-Desaturase,
  - 30 m) Nukleinsäuren kodierend eine Zeta-Carotin-Desaturase,
  - n) Nukleinsäuren kodierend ein crtISO Protein,
  - o) Nukleinsäuren kodierend ein FtsZ Protein,
  - p) Nukleinsäuren kodierend ein MinD Protein,
  - q) doppelsträngige endogenen  $\beta$ -Hydroxylase Ribonukleinsäuresequenz und/oder endogene  $\beta$ -Hydroxylase antisense-Ribonukleinsäuresequenzen und
  - 35 r) doppelsträngige  $\epsilon$ -Cyclase- Ribonukleinsäuresequenz und/oder  $\epsilon$ -Cyclase antisense-Ribonukleinsäuresequenz,
- wobei die Nukleinsäuren mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.
- 40

Es ist, insbesondere in Pflanzen, technisch nur schwer zu realisieren, mehr als vier Aktivitäten mit einem Nukleinsäurekonstrukt zu erhöhen oder zu erniedrigen. Daher werden bevorzugt Kombinationen von Nukleinsäurekonstrukten verwendet um die Aktivi-

45

täten, insbesondere um mehr als 4 Aktivitäten im Organismus zu erhöhen oder zu erniedrigen.

Es ist jedoch auch möglich, genetisch veränderte Organismen zu kreuzen, die bereits veränderte Aktivitäten enthalten. Beispielsweise ist es durch Kreuzen von genetisch veränderten Organismen, die jeweils zwei veränderte Aktivitäten enthalten, möglich, Organismen mit vier veränderten Aktivitäten herzustellen. Gleiches kann auch erreicht werden, indem man eine Kombination von zwei Nukleinsäurekonstrukten die jeweils 2 Aktivitäten verändern in den Organismus einführt.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die bevorzugten genetisch veränderten Organismen durch Einbringen von Kombinationen von Nukleinsäurekonstrukten hergestellt.

Bevorzugte erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukte enthalten folgende Kombinationen von Nukleinsäuren mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten:

- Ketolase + epsilon
- Ketolase + beta
- Ketolase + hydro (OEX)
- 25 Ketolase + epsilon + beta
- Ketolase + epsilon + hydro (RNAi)
- Ketolase + epsilon + hydro (OEX)
- Ketolase + beta + hydro (RNAi)
- Ketolase + beta + hydro (OEX)
- 30 Ketolase + epsilon + (xxx)
- Ketolase + epsilon + beta + hydro (OEX)
- Ketolase + epsilon + beta + hydro (RNAi)
- Ketolase+ epsilon + beta
- Ketolase + epsilon + hydro (OEX)
- 35 Ketolase + epsilon + hydro (RNAi)
- Ketolase + epsilon + hydro (OEX) + hydro (RNAi)
- Ketolase + beta + hydro (OEX) + hydro (RNAi)
- Ketolase+ epsilon + beta + (xxx)
- Ketolase + epsilon + beta + hydro (OEX) + hydro (RNAi)
- 40 Ketolase + epsilon + beta + hydro (OEX)
- Ketolase + epsilon + beta + hydro (RNAi)
- Ketolase + epsilon + hydro (RNAi) + (xxx)
- Ketolase + epsilon + hydro (OEX) + (xxx)
- Ketolase + beta + hydro (RNAi) + (xxx)
- 45 Ketolase + beta + hydro (OEX) + (xxx)
- Ketolase + epsilon + beta + hydro (OEX) + hydro (RNAi)
- Ketolase + epsilon + beta + hydro (OEX) + (xxx)



## 103

Ketolase + epsilon + beta + hydro (RNAi) + (xxx),

wobei die Abkürzungen folgende Bedeutung haben:

- 5 Ketolase: Nukleinsäuren kodierend eine Ketolase  
 beta: Nukleinsäuren kodierend eine  $\beta$ -Cyclase  
 hxdro (OEX): Expression von Nukleinsäuren kodierend eine  $\beta$ -Hydroxylase  
 hydro (RNAi): doppelsträngige endogene  $\beta$ -Hydroxylase Ribo-  
 10 nukleinsäuresequenz und/oder endogene  $\beta$ -Hydroxy-  
 lase antisense-Ribonukleinsäuresequenzen  
 epsilon: doppelsträngige  $\epsilon$ -Cyclase- Ribonukleinsäuresequenz  
 und/oder  $\epsilon$ -Cyclase antisense-Ribonukleinsäure-  
 sequenz  
 15 (xxx): mindestens eine Nukleinsäure ausgewählt aus Gruppe  
 Nukleinsäuren kodierend eine HMG-CoA-Reduktase,  
 Nukleinsäuren kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-  
 Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase, Nuklein-  
 säuren kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-  
 20 Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine 1-Deoxy-  
 D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase, Nuklein-  
 säuren kodierend eine Isopentenyl-Diphosphat-  
 $\Delta$ -Isomerase, Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-  
 Diphosphat-Synthase, Nukleinsäuren kodierend  
 25 eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase, Nukleinsäuren  
 kodierend eine Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Syn-  
 thase, Nukleinsäuren kodierend eine Phytoen-Syn-  
 thase, Nukleinsäuren kodierend eine Phytoen-Desa-  
 turase, Nukleinsäuren kodierend eine Zeta-Carotin-  
 30 Desaturase, Nukleinsäuren kodierend ein crtISO  
 Protein, Nukleinsäuren kodierend ein FtsZ Protein  
 und Nukleinsäuren kodierend ein MinD Protein.

- 35 Vorzugsweise enthalten die Regulationssignale einen oder mehrere  
 Promotoren, die die Transkription und Translation in Pflanzen  
 gewährleisten.

- Die Expressionskassetten beinhalten Regulationssignale, also  
 regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der  
 40 kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevor-  
 zugten Ausführungsform umfasst eine Expressionskassette stromauf-  
 wärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor  
 und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal  
 und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit  
 45 der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für mindestens eines  
 der vorstehend beschriebenen Gene operativ verknüpft sind. Unter  
 einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anord-

nung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, das jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.

5

Im folgenden werden beispielhaft die bevorzugten Nukleinsäurekonstrukte, Expressionskassetten und Vektoren für Pflanzen und Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen, sowie die transgenen Pflanzen selbst beschrieben.

10

Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER),

15

im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693 -8711).

20

Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann.

"Konstitutiver" Promotor meint solche Promotoren, die eine

25

Expression in zahlreichen, bevorzugt allen, Geweben über einen größeren Zeitraum der Pflanzenentwicklung, bevorzugt zu allen Zeitpunkten der Pflanzenentwicklung, gewährleisten.

Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der Promotor des 35S-Transkriptes des CaMV Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al. (1980) Cell 21:285-294; Odell et al. (1985) Nature 313:810-812; Shewmaker et al. (1985) Virology 140:281-288; Gardner et al. (1986) Plant Mol Biol

35

6:221-228) oder der 19S CaMV Promotor (US 5,352,605; WO 84/02913; Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202).

Ein weiterer geeigneter konstitutiver Promotor ist der pds Promoter (Pecker et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci USA 89:

40

4962-4966) oder der "Rubisco small subunit (SSU)"-Promotor (US 4,962,028), der LeguminB-Promotor (GenBank Acc.-Nr. X03677), der Promotor der Nopalinsynthase aus Agrobacterium, der TR-Doppelpromotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus Agrobacterium, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al. (1995) Plant

45

Mol Biol 29:637-649), den Ubiquitin 1 Promotor (Christensen et al. (1992) Plant Mol Biol 18:675-689; Bruce et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:9692-9696), den Smas Promotor, den Cinnamyl-

alkoholdehydrogenase-Promotor (US 5,683,439), die Promotoren der vakuolärer ATPase Untereinheiten oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91/13991), der Pnit-Promoter (Y07648.L, Hillebrand et al. (1998), Plant. Mol. Biol. 36, 89-99, 5 Hillebrand et al. (1996), Gene, 170, 197-200, der Ferredoxin-NADPH-Oxidoreductase Promotor (Datenbankeintrag AB011474, Position 70127 bis 69493), der TPT-Promoter (WO 03006660), der „Superpromotor“ (US-Patent 5955646), der 34S-Promotor (US-Patent 6051753) sowie weitere Promotoren von Genen, deren konstitutive 10 Expression in Pflanzen dem Fachmann bekannt ist.

Die Expressionskassetten können auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten (Übersichtsartikel: Gatz et al. (1997) Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48:89-108), durch den die Ex- 15 pression des Ketolase-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren, wie z.B. der PRP1 Promotor (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), durch Salicylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzolsulfonamid-induzierbarer Promotor (EP 0 388 186), 20 ein durch Tetrazyklin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J 2:397-404), ein durch Abscisinsäure induzierbarer Promotor (EP 0 335 528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer Promotor (WO 93/21334) können ebenfalls verwendet werden.

25 Ferner sind Promotoren bevorzugt, die durch biotischen oder abiotischen Stress induziert werden wie beispielsweise der pathogen-induzierbare Promotor des PRP1-Gens (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), der hitzeinduzierbare hsp70- oder 30 hsp80-Promoter aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare alpha-Amylase Promoter aus der Kartoffel (WO 96/12814), der licht-induzierbare PPK Promotor oder der verwundungsinduzierte pinII-Promoter (EP375091).

35 Pathogen-induzierbare Promotoren umfassen die von Genen, die infolge eines Pathogenbefalls induziert werden wie beispielsweise Gene von PR-Proteinen, SAR-Proteinen, b-1,3-Glucanase, Chitinase usw. (beispielsweise Redolfi et al. (1983) Neth J Plant Pathol 89:245-254; Uknes, et al. (1992) The Plant Cell 40 4:645-656; Van Loon (1985) Plant Mol Biol 4:111-116; Marineau et al. (1987) Plant Mol Biol 9:335-342; Matton et al. (1987) Molecular Plant-Microbe Interactions 2:325-342; Somssich et al. (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83:2427-2430; Somssich et al. (1988) Mol Gen Genetics 2:93-98; Chen et al. (1996) Plant J 45 10:955-966; Zhang and Sing (1994) Proc Natl Acad Sci USA

91:2507-2511; Warner, et al. (1993) Plant J 3:191-201; Siebertz et al. (1989) Plant Cell 1:961-968(1989).

Umfasst sind auch verwundungs-induzierbare Promotoren wie der  
 5 des pinII Gens (Ryan (1990) Ann Rev Phytopath 28:425-449; Duan et al. (1996) Nat Biotech 14:494-498), des wun1 und wun2-Gens (US 5,428,148), des win1- und win2-Gens (Stanford et al. (1989) Mol Gen Genet 215:200-208), des Systemin (McGurl et al. (1992) Science 225:1570-1573), des WIP1-Gens (Rohmeier et al. (1993)  
 10 Plant Mol Biol 22:783-792; Ekelkamp et al. (1993) FEBS Letters 323:73-76), des MPI-Gens (Corderok et al. (1994) The Plant J 6(2):141-150) und dergleichen.

Weitere geeignete Promotoren sind beispielsweise fruchtreifung-  
 15 spezifische Promotoren, wie beispielsweise der fruchtreifung-spezifische Promotor aus Tomate (WO 94/21794, EP 409 625).  
 Entwicklungsabhängige Promotoren schließt zum Teil die gewebe-spezifischen Promotoren ein, da die Ausbildung einzelner Gewebe naturgemäß entwicklungsabhängig erfolgt.

20 Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen beispielsweise die Biosynthese von Ketocarotinoiden bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Bevorzugt sind beispielsweise Promotoren  
 25 mit Spezifitäten für die Antheren, Ovarien, Petalen, Sepalen, Blüten, Blätter, Stengel und Wurzeln und Kombinationen hieraus.

Knollen-, Speicherwurzel- oder Wurzel-spezifische Promotoren sind beispielsweise der Patatin Promotor Klasse I (B33) oder  
 30 der Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel.

Blattspezifische Promotoren sind beispielsweise der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel (WO 97/05900), der SSU Promotor (small subunit) der Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphat-  
 35 carboxylase) oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al. (1989) EMBO J 8:2445-2451).

Blütenspezifische Promotoren sind beispielsweise der Phytoen Synthase Promotor (WO 92/16635), der Promotor des P-rr Gens  
 40 (WO 98/22593), der EPSPS-Promotor (Datenbankeintrag M37029), der DFR-A Promotor (Datenbankeintrag X79723), der B-Gen Promotor (WO 0008920) und der CHRC-Promotor (WO 98/24300; Vishnevetsky et al. (1996) Plant J. 10, 1111-1118) sowie die Promotoren der Arabidopsis Gen-Loci At5g33370 (infolge M1 Promoter), At5g22430  
 45 (infolge M2 Promoter) und At1g26630 (infolge M3 Promoter).

Antheren-spezifische Promotoren sind beispielsweise der 5126-Promotor (US 5,689,049, US 5,689,051), den glob-1 Promotor oder der g-Zein Promotor.

5 Weitere zur Expression in Pflanzen geeignete Promotoren sind beschrieben in Rogers et al. (1987) Methods in Enzymol 153:253-277; Schardl et al. (1987) Gene 61:1-11 und Berger et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:8402-8406).

10 Alle in der vorliegenden Anmeldung beschriebenen Promotoren ermöglichen in der Regel die Expression der Ketolase in Blütenblättern der erfindungsgemäßen Pflanzen.

Besonders bevorzugt im erfindungsgemäßen Verfahren sind konstitutive, blütenspezifische und insbesondere blütenblattspezifische Promotoren.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher insbesondere ein Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend funktionell verknüpft einen blütenspezifischen oder insbesondere einen blütenblattspezifischen Promotor und eine Nukleinsäure kodierend eine Ketolase.

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt vorzugsweise durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer vorstehend beschriebenen Nukleinsäure kodierend eine Ketolase und vorzugsweise einer zwischen Promotor und Nukleinsäure-Sequenz inserierten Nukleinsäure, die für ein plastidenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

Die vorzugsweise insertierte Nukleinsäuren kodierend ein plastidäres Transitpeptid, gewährleisten die Lokalisation in Plastiden und insbesondere in Chromoplasten.

Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren Nukleinsäure-Sequenz für ein Ketolase-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die Chromoplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Trans-

lokation der Ketolase in die Chromoplasten vom Ketolase-Teil enzymatisch abgespalten werden.

Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären *Nicotiana tabacum* Transketolase oder einem anderen Transitpeptid (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco (rbcS) oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase als auch der Isopentenylpyrophosphat Isomerase-2) oder dessen funktionellem Äquivalent abgeleitet ist.

10

Besonders bevorzugt sind Nukleinsäure-Sequenzen von drei Kassetten des Plastiden-Transitpeptids der plastidären Transketolase aus Tabak in drei Leserastern als KpnI/BamHI Fragmente mit einem ATG-Codon in der NcoI Schnittstelle:

15

pTP09

KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC  
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCTTCTTCTCTCACTTTTTCCGGCCTTAA  
20 ATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCGCCGTACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTCG  
TAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAC TGAGACTGCGGGA  
TCC\_BamHI

pTP10

25

KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC  
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCTTCTTCTCTCACTTTTTCCGGCCTTAA  
ATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCGCCGTACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTCG  
TAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAC TGAGACTGCGCTG  
30 GATCC\_BamHI

pTP11

KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC  
35 CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCTTCTTCTCTCACTTTTTCCGGCCTTAA  
ATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCGCCGTACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTCG  
TAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAC TGAGACTGCGGGG  
ATCC\_BamHI

40 Weitere Beispiele für ein plastidäres Transitpeptid sind das Transitpeptid der plastidären Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2) aus *Arabidopsis thaliana* und das Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Ribulosebisphosphat Carboxylase (rbcS) aus Erbse (Guerineau, F, Woolston, S, Brooks, L, Mullineaux, P  
45 (1988) An expression cassette for targeting foreign proteins into the chloroplasts. Nucl. Acids Res. 16: 11380).

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen Nukleinsäure-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen Genabschnitten 5 verschiedener Organismen bestehen.

Bevorzugt sind, wie vorstehend beschrieben, synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons, die von Pflanzen bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der 10 höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden.

Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu 15 erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

20 Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktions- 25 stellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die Expressionskassette beinhaltet vorzugsweise in der 30 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine kodierende Nukleinsäuresequenz oder ein Nukleinsäurekonstrukt und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

35 Beispiele für einen Terminator sind der 35S-Terminator (Guerineau et al. (1988) Nucl Acids Res. 16: 11380), der nos Terminator (Depicker A, Stachel S, Dhaese P, Zambryski P, Goodman HM. Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. J Mol Appl Genet. 1982;1(6):561-73) oder der ocs Terminator (Gielen, J, de 40 Beuckeleer, M, Seurinck, J, Debroek, H, de Greve, H, Lemmers, M, van Montagu, M, Schell, J (1984) The complete sequence of the TL-DNA of the Agrobacterium tumefaciens plasmid pTiAch5. EMBO J. 3: 835-846).

45 Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen,

Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, "primer-repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden.

5 Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

10 Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835 ff)

15 oder funktionelle Äquivalente.

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet.

20 Dazu können an sich bekannte Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt werden.

Geeignete Methoden zur Transformation von Pflanzen sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone - die sogenannte particle bombardment Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der, vorstehend beschriebene, durch *Agrobacterium*

30 vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-143 sowie in Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42  
35 (1991), 205-225) beschrieben.

Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 40 12 (1984), 8711) oder besonders bevorzugt pSUN2, pSUN3, pSUN4 oder pSUN5 (WO 02/00900).

Mit einem Expressionsplasmid transformierte Agrobakterien können in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer  
45



Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

Zur bevorzugten Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen, im folgenden auch transgene Pflanzen bezeichnet, wird die fusionierte Expressionskassette, die eine Ketolase exprimiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19 oder insbesondere pSUN2 kloniert, der geeignet ist, in *Agrobacterium tumefaciens* transformiert zu werden. Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

15 Die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 20 1993, S. 15-38. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein in die Expressionskassette integriertes Gen für die Expression einer Nukleinsäure kodierend eine Ketolase enthalten.

25 Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für eine Ketolase kodierenden Nukleinsäure wird eine Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71-119 (1993) beschrieben.

35 Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in *E. coli*, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pJIT117 (Guerineau et al. (1988) Nucl. Acids Res. 16 :11380), 40 pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren können.

Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression konstitutiv 45 oder vorzugsweise spezifisch in den Blütenblättern erfolgen.

Dementsprechend betrifft die Erfindung ferner ein Verfahren zur Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, das man ein Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend funktionell verknüpft einen blütenspezifischen Promotor und Nukleinsäuren kodierend eine Ketolase in das Genom der Ausgangspflanze einführt.

Die Erfindung betrifft ferner die genetisch veränderten Pflanzen, wobei die genetische Veränderung die Aktivität einer Ketolase in Blütenblättern,

A für den Fall, das die Wildtyppflanze bereits eine Ketolase-Aktivität in Blütenblättern aufweist, gegenüber dem Wildtyp erhöht und

B für den Fall, das die Wildtyppflanze keine Ketolase-Aktivität in Blütenblättern aufweist, gegenüber dem Wildtyp verursacht.

Wie vorstehend ausgeführt erfolgt die Erhöhung oder Verursachung der Ketolase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp vorzugsweise durch eine Erhöhung oder Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Ketolase.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt, wie vorstehend ausgeführt, die Erhöhung oder Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Ketolase durch Einbringen von Nukleinsäuren kodierend eine Ketolase in die Pflanzen und damit vorzugsweise durch Überexpression oder transgene Expression von Nukleinsäuren kodierend eine Ketolase.

Bevorzugte transgene Pflanzen, die als Wildtyp keine Ketolaseaktivität in den Blütenblättern aufweisen, enthalten, wie vorstehend erwähnt, mindestens ein transgene Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase.

Besonders bevorzugte, genetisch veränderte Pflanzen weisen, wie vorstehend erwähnt, zusätzlich eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und/oder  $\beta$ -Cyclase-Aktivität gegenüber einer Wildtyppflanze auf. Weiter bevorzugte Ausführungsformen sind vorstehend im erfindungsgemäßen Verfahren beschrieben.

Weiter bevorzugte, genetisch veränderte Pflanzen weisen, wie vorstehend erwähnt, zusätzlich eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität gegenüber einer Wildtyppflanze auf. Weiter bevorzugte Ausführungsformen sind vorstehend im erfindungsgemäßen Verfahren beschrieben.

- Weiter besonders bevorzugte, genetisch veränderte Pflanzen weisen, wie vorstehend erwähnt, zusätzlich gegenüber dem Wildtyp mindestens eine weitere erhöhte Aktivität, ausgewählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-  
 5 2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität, Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase-Aktivität, Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität,  
 10 tät, Phytoen-Synthase-Aktivität, Phytoen-Desaturase-Aktivität, Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität, crtISO-Aktivität, FtsZ-Aktivität und MinD-Aktivität auf. Weiter bevorzugte Ausführungsformen sind vorstehend im erfindungsgemäßen Verfahren beschrieben.
- 15 Weiter besonders bevorzugte, genetisch veränderte Pflanzen weisen, wie vorstehend erwähnt, zusätzlich gegenüber dem Wildtyp eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase Aktivität auf. Weiter bevorzugte Ausführungsformen sind vorstehend im erfindungsgemäßen Verfahren beschrieben.
- 20 Unter Pflanzen werden erfindungsgemäß vorzugsweise Pflanzen verstanden, die als Wildtyp in Blütenblättern Chromoplasten aufweisen. Weiter bevorzugte Pflanzen weisen als Wildtyp in den Blütenblättern zusätzlich Carotinoide, insbesondere  $\beta$ -Carotin, Zeaxanthin, Violaxanthin oder Lutein auf. Weiter bevorzugte Pflanzen  
 25 weisen als Wildtyp in den Blütenblättern zusätzlich eine  $\beta$ -Cy-clase-Aktivität auf. Weiter bevorzugte Pflanzen weisen als Wildtyp in den Blütenblättern zusätzlich eine Hydroxylase-Aktivität auf.
- 30 Besonders bevorzugte Pflanzen sind Pflanzen ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae,  
 35 Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Illiaceae oder Lamiaceae.
- Die Erfindung betrifft daher insbesondere genetisch veränderte  
 40 Pflanzen ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Astera-  
 45 ceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae,

Illiaceae, oder Lamiaceae enthaltend mindestens eine transgene Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase.

Ganz besonders bevorzugte genetisch veränderte Pflanzen sind ausgewählt aus den Pflanzengattungen Marigold, Tagetes erecta, Tagetes patula, Adonis, Lycopersicon, Rosa, Calendula, Physalis, Medicago, Helianthus, Chrysanthemum, Aster, Tulipa, Narcissus, Petunia, Geranium oder Tropaeolum, wobei die genetisch veränderte Pflanze mindestens eine transgene Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthält.

Wie vorstehend erwähnt wird in bevorzugten transgenen Pflanzen die Ketolase in Blütenblättern exprimiert, besonderes bevorzugt ist die Expression der Ketolase in Blütenblättern am höchsten.

Die transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile, insbesondere deren Blütenblätter sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Die genetisch veränderten Pflanzen können, wie vorstehend beschrieben, zur Herstellung von Ketocarotinoiden, insbesondere Astaxanthin verwendet werden.

Von Menschen und Tieren verzehrbare erfindungsgemäße, genetisch veränderte Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Ketocarotinoiden können auch beispielsweise direkt oder nach an sich bekannter Prozessierung als Nahrungsmittel oder Futtermittel oder als Futter- und Nahrungsergänzungsmittel verwendet werden. Ferner können die genetisch veränderten Pflanzen zur Herstellung von Ketocarotinoid-haltigen Extrakten der Pflanzen und/oder zur Herstellung von Futter- und Nahrungsergänzungsmitteln verwendet werden.

Die genetisch veränderten Pflanzen können auch als Zierpflanzen im Horticulture-Bereich verwendet werden.

Die genetisch veränderten Pflanzen weisen im Vergleich zum Wildtyp einen erhöhten Gehalt an Ketocarotinoiden auf.

Unter einem erhöhten Gehalt an Ketocarotinoiden wird in der Regel ein erhöhter Gehalt an Gesamt-Ketocarotinoid verstanden.

Unter einem erhöhten Gehalt an Ketocarotinoiden wird aber auch insbesondere ein veränderter Gehalt der bevorzugten Ketocarotinoide verstanden, ohne dass zwangsläufig der Gesamt-Carotinoidgehalt erhöht sein muss.

## 115

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform weisen die erfindungsgemäßen, genetisch veränderten Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp einen erhöhten Gehalt an Astaxanthin auf.

- 5 Unter einem erhöhten Gehalt wird in diesem Fall auch ein verursachter Gehalt an Ketocarotinoiden, bzw. Astaxanthin verstanden.

Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

10

Allgemeine Experimentelle Bedingungen:  
Sequenzanalyse rekombinanter DNA

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem

- 15 Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma Licor (Vertrieb durch MWG Biotech, Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463-5467).

Beispiel 1:

- 20 Amplifikation einer cDNA, die die gesamte Primärsequenz der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille kodiert

Die cDNA, die für die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* kodiert, wurde mittels PCR aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm

- 25 192.80 der "Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen") Suspensionskultur amplifiziert.

Für die Präparation von Total-RNA aus einer Suspensionskultur von *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80), die 2 Wochen mit indirek-

- 30 tem Tageslicht bei Raumtemperatur in *Haematococcus*-Medium (1.2 g/l Natriumacetat, 2 g/l Hefeextrakt, 0.2 g/l  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , 0.02  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ; pH 6.8; nach Autoklavieren Zugabe von 400 mg/l L-Asparagin, 10 mg/l  $FeSO_4 \cdot xH_2O$ ) gewachsen war, wurden die Zellen geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Mörser pulverisiert. Anschließend wurden 100 mg der gefrorenen, pulverisierten Algenzellen in ein Reaktionsgefäß überführt und in 0.8 ml Trizol-Puffer (LifeTechnologies) aufgenommen. Die Suspension wurde mit 0.2 ml Chloroform extrahiert. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 12 000 g wurde der wässrige Überstand abgenommen
- 40 und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Ethanol extrahiert. Die RNA wurde mit einem Volumen Isopropanol gefällt, mit 75% Ethanol gewaschen und das Pellet in DEPC Wasser (über Nacht Inkubation von Wasser mit 1/1000 Volumen Diethylpyrocarbonat bei Raumtemperatur, anschließend autoklaviert) gelöst.
- 45 Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

## 116

Für die cDNA-Synthese wurden 2.5 µg Gesamt-RNA für 10 min bei 60°C denaturiert, für 2 min auf Eis abgekühlt und mittels eines cDNA-Kits (Ready-to-go-you-prime-beads, Pharmacia Biotech) nach Herstellerangaben unter Verwendung eines antisense spezifischen  
5 Primers (PR1 SEQ ID NO: 29) in cDNA umgeschrieben.

Die Nukleinsäure kodierend eine Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Haematococcus pluvialis* unter Verwendung eines sense  
10 spezifischen Primers (PR2 SEQ ID NO: 30) und eines antisense spezifischen Primers (PR1 SEQ ID NO: 29) amplifiziert.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

15 Die PCR zur Amplifikation der cDNA, die für ein Ketolase Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 4 µl einer *Haematococcus pluvialis* cDNA (hergestellt wie oben  
20 beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR1 (SEQ ID NO: 29)
- 0.2 mM PR2 (SEQ ID NO: 30)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 25 - 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25.8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

30	1X	94°C	2 Minuten
	35X	94°C	1 Minute
		53°C	2 Minuten
		72°C	3 Minuten
	1X	72°C	10 Minuten

35

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 29 und SEQ ID NO: 30 resultierte in einem 1155 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert (SEQ ID NO: 22). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-  
40 Klonierungsvektor pGEM-Teasy (Promega) kloniert und der Klon pGKET02 erhalten.

Sequenzierung des Klons pGKET02 mit dem T7- und dem SP6-Primer bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in den drei Codons  
45 73, 114 und 119 in je einer Base von der publizierten Sequenz X86782 unterscheidet. Diese Nukleotidaustausche wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsen-

tieren somit die Nukleotidsequenz im verwendeten *Haematococcus pluvialis* Stamm 192.80 (Abbildung 3 und 4, Sequenzvergleiche).

Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet. Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1027 Bp SpHI-Fragmentes aus pGEM-Teasy und Ligierung in den SpHI geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der die *Haematococcus pluvialis* Ketolase in der korrekten Orientierung als N-terminale translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heißt pJKETO2.

#### Beispiel 2:

Amplifikation einer cDNA, die die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille mit einem um 14 Aminosäuren verkürztem N-terminus kodiert

Die cDNA, die für die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) mit einem um 14 Aminosäuren verkürztem N-Terminus kodiert, wurde mittels PCR aus *Haematococcus pluvialis* Suspensionskultur (Stamm 192.80 der "Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen") amplifiziert.

Die Präparation von Total-RNA aus einer Suspensionskultur von *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) erfolgte wie in Beispiel 1 beschrieben.

Die cDNA-Synthese erfolgte wie unter Beispiel 1 beschrieben.

Die Nukleinsäure kodierend eine Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) mit einem um 14 Aminosäuren verkürztem N-Terminus wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Haematococcus pluvialis* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR3 SEQ ID NO: 31) und eines antisense spezifischen Primers (PR1 SEQ ID NO: 29) amplifiziert.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der cDNA, die für ein Ketolase Protein mit um 14 Aminosäuren verkürztem N-Terminus kodiert, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 4 µl einer *Haematococcus pluvialis* cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 45 - 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR1 (SEQ ID NO: 29)
- 0.2 mM PR3 (SEQ ID NO: 31)

## 118

- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25.8 µl Aq. Dest.

5 Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

	1X	94°C	2 Minuten
	35X	94°C	1 Minute
		53°C	2 Minuten
10		72°C	3 Minuten
	1X	72°C	10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 29 und SEQ ID NO: 31 resultierte in einem 1111 Bp Fragment, das für ein Ketolase Protein  
 15 kodiert, bei dem N-terminalen Aminosäuren (Position 2-16) durch eine einzige Aminosäure (Leucin) ersetzt sind.

Das Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-Teasy (Promega) kloniert. Sequenzie-  
 20 rungen mit mit den Primern T7- und SP6 bestätigten eine zur Sequenz SEQ ID NO: 22 identische Sequenz, wobei die 5'Region (Position 1-53) der SEQ ID NO: 22 im Amplifikat SEQ ID NO: 24 durch eine in der Sequenz abweichende Nonamersequenz ersetzt wurde. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvek-  
 25 tor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 985 Bp SpHI Fragmentes aus pGEM-Teasy und Ligierung mit dem SpHI geschnittenen Vek-  
 30 tor pJIT117. Der Klon, der die *Haematococcus pluvialis* Ketolase mit einem um 14 Aminosäuren verkürztem N-Terminus in der korrekten Orientierung als N-terminale translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJKETO3.

### 35 Beispiel 3:

Amplifikation einer cDNA, die die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille (Stamm 192.80 der "Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen") bestehend aus der gesamten Primärsequenz und fusioniertem C-terminalem myc-Tag kodiert.

40

Die cDNA, die für die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) bestehend aus der gesamten Primärsequenz und fusioniertem C-terminalem myc-Tag kodiert, wurde mittels PCR unter Verwendung des Plasmids pJKETO2 (in Beispiel 1 beschrieben) und des Primers  
 45 PR15 (SEQ ID NO: 32) hergestellt. Der Primer PR15 setzt sich zusammen aus einer antisense spezifischen 3'Region (Nucleotide



## 119

40 bis 59) und einer myc-Tag kodierenden 5'Region (Nucleotide 1 bis 39).

Die Denaturierung (5 min bei 95°C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40°C) von pGKETO2 und PR15 erfolgte in einem 11.5 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µg pGKETO2 PlasmidDNA
- 0.1 µg PR15 (SEQ ID NO: 32)

10

Das Auffüllen der 3'Enden (30 min bei 30°C) erfolgte in einem 20 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 11.5 µl pGKETO2/PR15-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)

15

- 50 µM dNTPs
- 2 µl 1X Klenow Puffer
- 2U Klenow Enzym

20 Die Nukleinsäure kodierend eine Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) bestehend aus der gesamten Primärsequenz und fusioniertem C-terminalem myc-Tag wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Haematococcus pluvialis* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR2 SEQ ID NO: 30) und eines antisense spezifischen Primers (PR15 SEQ ID NO: 32) amplifiziert.

25

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der cDNA, die für ein Ketolase Protein mit fusioniertem C-terminalem myc-Tag kodiert, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

30

- 1 µl einer Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 35 - 0.2 mM PR15 (SEQ ID NO: 32)
- 0.2 mM PR2 (SEQ ID NO: 30)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 µl Aq. Dest.

40

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

45	1X	94°C	2 Minuten
	35X	94°C	1 Minute
		53°C	1 Minute
		72°C	1 Minute
	1X	72°C	10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO:32 und SEQ ID NO:30 resultierte in einem 1032 Bp-Fragment, das für ein Protein kodiert, bestehend aus der gesamten Primärsequenz der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* als zweifache translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptide am N-Terminus und dem myc-Tag am C-Terminus.

Das Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-Teasy (Promega) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern T7- und SP6 bestätigten eine zur Sequenz SEQ ID NO: 22 identische Sequenz, wobei die 3'Region (Position 993 bis 1155) der SEQ ID NO: 22 im Amplifikat SEQ ID NO: 26 durch eine in der abweichende Sequenz aus 39 Bp ersetzt wurde. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1038 Bp EcoRI-SpHI Fragmentes aus pGEM-Teasy und Ligierung mit dem EcoRI-SpHI geschnittenen Vektor pJIT117. Durch die Ligation entsteht eine translationale Fusion zwischen dem C-Terminus der rbcS Transitpeptidsequenz und dem N-Terminus der Ketolase Sequenz. Der Klon, der die *Haematococcus pluvialis* Ketolase mit fusioniertem C-terminalen myc-Tag in der korrekten Orientierung als translationale N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJKETO4.

Beispiel 4:

Herstellung von Expressionsvektoren zur konstitutiven Expression der *Haematococcus pluvialis* Ketolase in *Lycopersicon esculentum* und *Tagetes erecta*.

30

Die Expression der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *L. esculentum* und in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle des konstitutiven Promoters d35S aus CaMV (Franck et al. 1980, Cell 21: 285-294). Die Expression erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715).

Die Herstellung einer Expressionskassette für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3 (WO02/00900).

- Zur Herstellung des Expressionsvektors pS3KETO2 wurde das 2.8 Kb SacI-XhoI Fragment aus pJKETO2 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert (Abbildung 5A, Konstruktkarte). In der Abbildung 5A beinhaltet Fragment d35S den duplizierten 35S Promoter (747 bp), Fragment rbcS das rbcS Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment KETO2 (1027 bp) die gesamte

Primärsequenz kodierend für die *Haematococcus pluvialis* Ketolase, Fragment *term* (761 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

- 5 - Zur Herstellung des Expressionsvektors pS3KETO3 wurde das 2.7 Kb bp *SacI*-*XhoI* Fragment aus pJKETO3 mit dem *SacI*-*XhoI* geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert. (Abbildung 6, Konstruktkarte). In der Abbildung 6 beinhaltet Fragment *d35S* den duplizierten 35S Promoter (747 bp), Fragment *rbcS* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment *KETO3* (985 bp) die um 14 N-terminale Aminosäuren verkürzte Primärsequenz kodierend für die *Haematococcus pluvialis* Ketolase, Fragment *term* (761 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.
- 10
- 15 - Zur Herstellung des Expressionsvektors pS3KETO4 wurde das 2.8 Kb *SacI*-*XhoI* Fragment aus pJKETO4 mit dem *SacI*-*XhoI* geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert. (Abbildung 7, Konstruktkarte). In der Abbildung 7 beinhaltet Fragment *d35S* den duplizierten 35S Promoter ((747 bp), Fragment *rbcS* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment *KETO4* (1038 bp) die gesamte Primärsequenz kodierend für die *Haematococcus pluvialis* Ketolase mit C-terminalem myc-Tag, Fragment *term* (761 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.
- 20
- 25 Die Herstellung einer Expressionskassette für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).
- 30 - Zur Herstellung des *Tagetes*-Expressionsvektors pS5KETO2 wurde das 2.8 Kb *SacI*-*XhoI* Fragment aus pJKETO2 mit dem *SacI*-*XhoI* geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 5B, Konstruktkarte). In der Abbildung 5B beinhaltet Fragment *d35S* den duplizierten 35S Promoter (747 bp), Fragment *rbcS* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment *KETO2* (1027 bp) die gesamte Primärsequenz kodierend für die *Haematococcus pluvialis* Ketolase, Fragment *term* (761 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.
- 35
- 40 Beispiel 5A:  
Herstellung von Expressionsvektoren zur blütenspezifischen Expression der *Haematococcus pluvialis* Ketolase in *Lycopersicon esculentum* und *Tagetes erecta*.
- 45 Die Expression der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *L. esculentum* und *Tagetes erecta* erfolgte mit dem Transitpeptid *rbcS* aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715). Die

## 122

Expression erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blütenspezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis thaliana* (AL132971: Nukleotidregion 9298 bis 10200; Hill et al. (1998) Development 125: 1711-1721).

5

Das DNA Fragment, das die AP3 Promoterregion -902 bis +15 aus *Arabidopsis thaliana* beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethoden aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) sowie der Primer PR7 (SEQ ID NO: 33) und PR10 (SEQ ID NO: 36) hergestellt.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das AP3-Promoterfragment (-902 bis +15) beinhaltet, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 100 ng genomischer DNA aus *A.thaliana*
- 0.25 mM dNTPs
- 20 - 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 33)
- 0.2 mM PR10 (SEQ ID NO: 36)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

25 Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
	50°C	1 Minute
30	72°C	1 Minute
1X	72°C	10 Minuten

Das 922 Bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und 35 das Plasmid pTAP3 erhalten.

Sequenzierung des Klons pTAP3 bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in durch eine Insertion (ein G in Position 9765 der Sequenz AL132971) und einen Basenaustausch (ein G statt ein A in Position 9726 der Sequenz AL132971) von der publizierten AP3 Sequenz (AL132971, Nukleotidregion 9298 bis 10200) unterscheidet. Diese Nukleotidunterschiede wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die tatsächliche Nukleotidsequenz in den verwendeten *Arabidopsis* 45 *thaliana* Pflanzen.

## 123

Die modifizierte Version AP3P wurde mittels rekombinanter PCR unter Verwendung des Plasmids pTAP3 hergestellt. Die Region 10200 bis 9771 wurde mit den Primern PR7 (SEQ ID NO: 33) und Primern PR9 (SEQ ID NO: 35) amplifiziert (Amplifikat A7/9), die Region 5 9526 bis 9285 wurde mit den PR8 (SEQ ID NO: 34) und PR10 (SEQ ID NO: 36) amplifiziert (Amplifikat A8/10).

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

10 Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der DNA-Fragmente, die die Regionen Region 10200-9771 und Region 9526 bis 9285 des AP3 Promoters beinhalten, erfolgte in 50  $\mu$ l Reaktionsansätzen, in denen enthalten war:

- 15 - 100 ng AP3 Amplifikat (oben beschrieben)
  - 0.25 mM dNTPs
  - 0.2 mM sense Primer (PR7 SEQ ID NO: 33 bzw. PR8 SEQ ID NO: 34)
  - 0.2 mM antisense Primer (PR9 SEQ ID NO: 35 bzw. PR10 SEQ ID NO: 36)
- 20 - 5  $\mu$ l 10X PCR-Puffer (Stratagene)
  - 0.25  $\mu$ l Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
  - 28.8  $\mu$ l Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

25	1X	94°C	2 Minuten
	35X	94°C	1 Minute
		50°C	1 Minute
		72°C	1 Minute
30	1X	72°C	10 Minuten

Die rekombinante PCR beinhaltet Annealing der sich über eine Sequenz von 25 Nukleotiden überlappenden Amplifikate A7/9 und A8/10, Vervollständigung zu einem Doppelstrang und anschließende 35 Amplifizierung. Dadurch entsteht eine modifizierte Version des AP3 Promoters, AP3P, in dem die Positionen 9670 bis 9526 deletiert sind. Die Denaturierung (5 min bei 95°C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40°C) beider Amplifikate A7/9 und A8/10 erfolgte in einem 17.6  $\mu$ l Reaktionsansatz, in 40 dem enthalten war:

- 0.5  $\mu$ g A7/9 Amplifikat
- 0.25  $\mu$ g A8/10 Amplifikat

## 124

Das Auffüllen der 3'Enden (30 min bei 30°C) erfolgte in einem 20 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 17.6 µgA7/9 und A8/10-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 50 µM dNTPs
- 2 µl 1X Klenow Puffer
- 2U Klenow Enzym

10 Die Nukleinsäure kodierend für die modifizierte Promoterversion AP3P wurde mittels PCR unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR7 SEQ ID NO: 33) und eines antisense spezifischen Primers (PR10 SEQ ID NO: 36) amplifiziert.

15 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des AP3P Fragmentes erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 20 - 1 µl Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
  - 0.25 mM dNTPs
  - 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 33)
  - 0.2 mM PR10 (SEQ ID NO: 36)
  - 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 25 - 0.25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
  - 28.8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

30	1X	94°C	2 Minuten
	35X	94°C	1 Minute
		50°C	1 Minute
		72°C	1 Minute
	1X	72°C	10 Minuten

35

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 33 und SEQ ID NO: 36 resultierte in einem 778 Bp Fragment das für die modifizierte Promoterversion AP3P kodiert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den

40 Primern T7 und M13 bestätigten eine zur Sequenz AL132971, Region 10200 bis 9298 identische Sequenz, wobei die interne Region 9285 bis 9526 deletiert wurde. Diese Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

45

## 125

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 771 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus pTAP3P und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter AP3P anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJAP3P.

5

Zur Herstellung einer Expressionskassette pJAP3PKETO2 wurde das 1027 Bp SpHI-Fragment KETO2 (in Beispiel 1 beschrieben) in den SpHI geschnittenen Vektor pJAP3P kloniert. Der Klon, der das Fragment KETO2 in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJAP3PKETO2.

10

Zur Herstellung einer Expressionskassetten pJAP3PKETO4 wurde das 1032 Bp SpHI-EcoRI Fragment KETO4 (in Beispiel 3 beschrieben) in den SpHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJAP3P kloniert. Der Klon, der das Fragment KETO4 in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJAP3PKETO4.

15

Die Herstellung eines Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der AP3P-kontrollierten Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3 (WO02/00900).

20

- Zur Herstellung des Expressionsvektors pS3AP3PKETO2 wurde das 2.8 KB bp SacI-XhoI Fragment aus pJAP3PKETO2 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert (Abbildung 8A, Konstruktkarte). In der Abbildung 8A beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment *rbcS* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment KETO2 (1027 bp) die gesamte Primärsequenz kodierend für die *Haematococcus pluvialis* Ketolase, Fragment *term* (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

25

30

- Zur Herstellung des Expressionsvektors pS3AP3PKETO4 wurde das 2.8 KB SacI-XhoI Fragment aus pJAP3PKETO4 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert. (Abbildung 9, Konstruktkarte). In der Abbildung 9 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment *rbcS* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment KETO4 (1038 bp) die gesamte Primärsequenz kodierend für die *Haematococcus pluvialis* Ketolase mit C-terminalem myc-Tag, Fragment *term* (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

35

40

45

## 126

Die Herstellung einer Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der AP3P-kontrollierten Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

5

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AP3PKETO2 wurde das 2.8 KB bp SacI-XhoI Fragment aus pJAP3PKETO2 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 8B, Konstruktkarte). In der Abbildung 8B beinhaltet Fragment AP3P den

- 10 modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment *rbcS* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment KETO2 (1027 bp) die gesamte Primärsequenz kodierend für die *Haematococcus pluvialis* Ketolase, Fragment *term* (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV

15

Beispiel 5B:

Amplifikation einer chimären cDNA, die die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille mit einer heterologen 5' nicht translatierten Region (5'UTR) beinhaltet, und Herstellung eines

- 20 Expressionsvektors zur blütenspezifischen Expression der *Haematococcus pluvialis* Ketolase ohne Verwendung eines heterologen Transitpeptides in *Lycopersicon esculentum*.

Die cDNA, die die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) folgend auf eine heterologe "5'nicht-translatierten Region" (5'UTR) enthält, wurde mittels PCR hergestellt.

25

Die Nukleinsäure kodierend eine Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) mit einer "5'nicht-translatierten Region" (5'UTR) wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus dem Plasmid pGKETO2 unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR142 SEQ ID NO: 78) und eines antisense spezifischen Primers (PR1 SEQ ID NO: 29) amplifiziert.

30

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

35

Die PCR zur Amplifikation des Fragmentes, das sowohl für ein Ketolase Protein kodiert als auch eine heterologe 5'UTR Region enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

40

- 10 ng des Plasmids pGKETO2 (in Beispiel 1 beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR1 (SEQ ID NO: 29)
- 0.2 mM PR142 (SEQ ID NO: 78)

45

- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25.8 µl Aq. Dest.



## 127

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
5	53°C	2 Minuten
	72°C	3 Minuten
1X	72°C	10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit PR1 und PR142 resultierte in einem  
 10 1.1 KB Fragment, das eine heterologe 5'UTR Region, gefolgt von  
 der kodierenden Region für ein Ketolase, enthält (SEQ ID NO: 79)

Das Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den  
 PCR-Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierung-  
 15 gen des resultierenden Klones pTA-KETO5 mit den Primern T7 und  
 M13 bestätigten eine Sequenz (SEQ ID NO: 79), die [abgesehen vom  
 5'Terminus, der identisch zu pJIT117 ist (Guerineau et al. 1988,  
 Nucl. Acids Res. 16: 11380)], identisch zur Sequenz SEQ ID NO: 22  
 ist. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expres-  
 20 sionsvektor pJAP3PKETO2 (Beispiel 5A) verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 0.3 KB HindIII Frag-  
 mentes aus pTA-KETO5 und Ligierung in den HindIII-geschnittenen  
 Vektor pJAP3PKETO2. Der Klon, der den AP3P Promoter, gefolgt vom  
 25 5'UTR aus pJIT117 und der kompletten kodierenden Sequenz für die  
*Haematococcus pluvialis* Ketolase enthält, heisst pJAP3PKETO5.

Die Expression der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *L.*  
*esculentum* erfolgte unter Kontrolle des Promoters AP3P (siehe  
 30 Beispiel 5A ) und des 5'UTRs aus pJIT117. Die Herstellung einer  
 Expressionskassette für die Agrobacterium-vermittelte Trans-  
 formation der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *L. esculen-*  
*tum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3  
 (WO 02/00900).

35 Zur Herstellung des Expressionsvektors pS3AP3PKETO5 wurde das 2.8  
 Kb SacI-XhoI Fragment aus pJAP3PKETO5 mit dem SacI-XhoI geschnit-  
 tenen Vektor pSUN3 ligiert (Abbildung 21, Konstruktkarte). In der  
 Abbildung 21 beinhaltet Fragment AP3P den AP3P-Promoter (747 bp),  
 40 Fragment 5'UTR die 5'UTR Sequenz aus pJIT117 (30 bp), Fragment  
 KETO5 (1.0 kb) die gesamte Primärsequenz kodierend für die *Haema-*  
*tococcus pluvialis* Ketolase, Fragment term (761 bp) das Polyade-  
 nylierungssignal von CamV.

## Beispiel 6:

Herstellung und Analyse transgener *Lycopersicon esculentum*  
Pflanzen

- 5 Transformation und Regeneration von Tomatenpflanzen erfolgte nach der publizierten Methode von Ling und Mitarbeitern (Plant Cell Reports (1998), 17:843-847). Für die Varietät Microtom wurde mit höherer Kanamycin-Konzentration (100mg/L) selektioniert.
- 10 Als Ausgangsexplantat für die Transformation dienten Kotyledonen und Hypokotyle sieben bis zehn Tage alter Keimlinge der Linie Microtom. Für die Keimung wurde das Kulturmedium nach Murashige und Skoog (1962: Murashige and Skoog, 1962, Physiol. Plant 15, 473-) mit 2 % Saccharose, pH 6.1 verwendet. Die Keimung fand bei 21°C
- 15 bei wenig Licht (20 bis 100 µE) statt. Nach sieben bis zehn Tagen wurden die Kotyledonen quer geteilt und die Hypokotyle in ca. 5 bis 10 mm lange Abschnitte geschnitten und auf das Medium MSBN (MS, pH 6,1, 3% Saccharose + 1 mg/l BAP, 0,1 mg/l NAA) gelegt, das am Vortag mit suspensionskultivierten Tomatenzellen beschickt
- 20 wurde. Die Tomatenzellen wurden luftblasenfrei mit sterilem Filterpapier abgedeckt. Die Vorkultur der Explantate auf dem beschriebenen Medium erfolgte für drei bis fünf Tage. Zellen des Stammes Agrobakterium tumefaciens LBA4404 wurden einzeln mit den Plasmiden pS3KETO2, pS3KETO3, pS3AP3PKETO5 bzw. pS3AP3KETO2
- 25 transformiert. Von den einzelnen mit den Binärvektoren pS3KETO2, pS3KETO3 bzw. pS3KETO2 transformierten Agrobakterium-Stämmen wurde jeweils eine Übernachtskultur in YEB Medium mit Kanamycin (20 mg/l) bei 28 Grad Celsius kultiviert und die Zellen zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde mit flüssigem MS Medium (3 %
- 30 Saccharose, pH 6,1) resuspendiert und auf eine optische Dichte von 0,3 (bei 600 nm) eingestellt. Die vorkultivierten Explantate wurden in die Suspension überführt und für 30 Minuten bei Zimmertemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Explantate mit sterilem Filterpapier getrocknet und
- 35 für die dreitägige Co-Kultur (21°C) auf ihr Vorkulturmedium zurück gelegt.

Nach der Co-kultur wurden die Explantate auf MSZ2 Medium (MS pH 6,1 + 3 % Saccharose, 2 mg/l Zeatin, 100 mg/l Kanamycin,

40 160 mg/l Timentin) transferiert und für die selektive Regeneration bei 21°C unter Schwachlicht Bedingungen (20 bis 100 µE, Lichtrhythmus 16 h/8 h) aufbewahrt. Alle zwei bis drei Wochen erfolgte der Transfer der Explantate bis sich Sprosse bilden. Kleine Sprosse konnten vom Explantat abgetrennt werden und auf MS

45 (pH 6,1 + 3 % Saccharose) 160 mg/l Timentin, 30 mg/l Kanamycin,

## 129

0,1 mg/l IAA bewurzelt werden. Bewurzelte Pflanzen wurden ins Gewächshaus überführt.

Gemäß der oben beschriebenen Transformationsmethode wurden mit 5 folgenden Expressionskonstrukten folgende Linien erhalten:

Mit pS3KETO2 wurde erhalten: cs13-8, cs13-24, cs13-30, cs13-40.

Mit pS3KETO3 wurde erhalten: cs14-2, cs14-3, cs14-9, cs14-19.

10

Mit pS3AP3PKETO2 wurde erhalten: cs16-15, cs16-34, cs16-35, cs16-40.

15

Tabelle 1a zeigt das Erscheinungsbild der Blütenblätter der erfindungsgemäß genetisch veränderten Tomatenpflanzen. Die Analyse der Ketocarotinoide erfolgte wie nachstehend beschrieben.

Tabelle 1a

20	Pflanze	Blütenfarbe	Astaxanthin	Adonixanthin
	Control	gelb	nein	nein
	Control	gelb	nein	nein
	CS13-8	orange	ja	ja
	CS13-24	orange	ja	ja
25	CS13-30	orange	ja	ja
	CS13-40	orange	ja	ja
	CS14-2	orange	ja	ja
	CS14-3	orange	ja	ja
	CS14-9	orange	ja	ja
	CS14-19	orange	ja	ja
30	CS16-15	orange	ja	ja
	CS 16-34	orange	ja	ja
	CS 16-35	orange	ja	ja
	CS 16-40	orange	ja	ja

35 Die Quantifizierung der Carotinoide erfolgte durch Extraktion der Pigmente in Aceton, enzymatische Hydrolyse der Carotinoidester und Auftrennung der freigesetzten Carotinoide mittels HPLC. Experimentelle Details sowie Laufbedingungen der HPLC-Trennungen sind in Beispiel 9 detailliert beschrieben.

40

45

## 130

Tabelle 1b zeigt das Carotinoidprofil in Petalen der gemäß der vorstehend beschriebenen Beispiele hergestellten transgenen Tomatenpflanzen einschließlich Kontrollen. Carotinoidkonzentrationen sind Mittelwerte verschiedener Linien und prozentual bezogen auf den Gehalt an Gesamtcarotinoiden.

Tabelle 1b

	Tomato	Viola-xanthin	Anthera-xanthin	Lutein	Zea-xanthin	Crypto-xanthin	Beta/zeta-carotene	Asta-xanthin	Adoni-xanthin	Adonirubin	3'-Hydroxyechinenone
10	control	70,6	14	13,2	1	0,2	0,95				
	CS16		0,5	1	3,2	0,3	15,3	61	4,1	15,2	
	plant										
	Cs 13			9,7	0,4	0,05	9	68	1,3	12,3	0,2
	plant										

15

Beispiel 7:

Herstellung transgener Tagetes Pflanzen

- 20 Tagetessamen werden sterilisiert und auf Keimungsmedium (MS-Medium; Murashige and Skoog, *Physiol. Plant.* 15(1962), 473-497) pH 5,8, 2 % Saccharose) aufgelegt. Die Keimung erfolgt in einem Temperatur/Licht/Zeitintervall von 18 bis 28°C/20-200 µE/3 bis 16 Wochen, bevorzugt jedoch bei 21°C, 20 bis 70 µE, für 4 bis 25 8 Wochen.

- 30 Alle Blätter der sich bis dahin entwickelten in vitro Pflanzen werden geerntet und quer zur Mittelrippe geschnitten. Die dadurch entstehenden Blattexplantate mit einer Größe von 10 bis 60 mm<sup>2</sup> werden im Verlaufe der Präparation in flüssigem MS-Medium bei Raumtemperatur für maximal 2 h aufbewahrt.

- 35 Ein beliebiger Agrobakterium tumefaciens Stamm, bevorzugt aber ein supervirulenter Stamm, wie z.B. EHA105 mit einem entsprechenden Binärplasmid, das ein Selektionsmarkergen (bevorzugt *bar* oder *pat*) sowie ein oder mehrere Trait- oder Reportergene tragen kann wird (beispielsweise pS5KETO2 und pS5AP3PKETO2), über Nacht angezogen und für die Co-Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet. Die Anzucht des Bakterienstammes kann wie folgt erfolgen: Eine Einzelkolonie des entsprechenden Stammes wird in YEB 40 (0,1 % Hefeextrakt, 0,5 % Rindfleischextrakt, 0,5 % Pepton, 0,5 % Saccharose, 0,5 % Magnesiumsulfat x 7 H<sub>2</sub>O) mit 25 mg/l Kanamycin angeimpft und bei 28°C für 16 bis 20 h angezogen. Anschließend wird die Bakteriensuspension durch Zentrifugation bei 6000 g für 45 10 min geerntet und derart in flüssigem MS Medium resuspendiert,

## 131

dass eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,1 bis 0,8 entstand. Diese Suspension wird für die C-Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet.

Unmittelbar vor der Co-Kultivierung wird das MS-Medium, in dem die Blätter aufbewahrt worden sind, durch die Bakteriensuspension ersetzt. Die Inkubation der Blättchen in der Agrobakteriensuspension erfolgte für 30 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur. Anschließend werden die infizierten Explantate auf ein mit Agar (z.B. 0,8 % Plant Agar (Duchefa, NL) verfestigtes MS-Medium mit Wachstumsregulatoren, wie beispielsweise 3 mg/l Benzylaminopurin (BAP) sowie 1 mg/l Indolyllessigsäure (IAA) aufgelegt. Die Orientierung der Blätter auf dem Medium ist bedeutungslos. Die Kultivierung der Explantate findet für 1 bis 8 Tage, bevorzugt aber für 6 Tage statt, dabei können folgende Bedingungen angewendet werden: Lichtintensität: 30 bis 80 µMol/m<sup>2</sup> x sec, Temperatur: 22 bis 24°C, hell/dunkel Wechsel von 16/8 Stunden. Anschließend werden die co-kultivierten Explantate auf frisches MS-Medium, bevorzugt mit den gleichen Wachstumsregulatoren übertragen, wobei dieses zweite Medium zusätzlich ein Antibiotikum zur Unterdrückung des Bakterienwachstums enthält. Timentin in einer Konzentration von 200 bis 500 mg/l ist für diesen Zweck sehr geeignet. Als zweite selektive Komponente wird eine für die Selektion des Transformationserfolges eingesetzt. Phosphinothricin in einer Konzentration von 1 bis 5 mg/l selektiert sehr effizient, aber auch andere selektive Komponenten gemäß des zu verwendenden Verfahrens sind denkbar.

Nach jeweils ein bis drei Wochen erfolgt der Transfer der Explantate auf frisches Medium bis sich Sprossknospen und kleine Sprosse entwickeln, die dann auf das gleiche Basalmedium einschließlich Timentin und PPT oder alternative Komponenten mit Wachstumsregulatoren, nämlich z.B. 0,5 mg/l Indolylbuttersäure (IBA) und 0,5 mg/l Gibberillinsäure GA<sub>3</sub>, zur Bewurzelung übertragen werden. Bewurzelte Sprosse können ins Gewächshaus überführt werden.

Zusätzlich zu der beschriebenen Methode sind folgende vorteilhafte Modifikationen möglich:

- 40 • Bevor die Explantate mit den Bakterien infiziert werden, können sie für 1 bis 12 Tage, bevorzugt 3 bis 4, auf das oben beschriebene Medium für die Co-Kultur vorinkubiert werden. Anschließend erfolgt die Infektion, Co-Kultur und selektive Regeneration wie oben beschrieben.

132

- Der pH Wert für die Regeneration (normalerweise 5,8) kann auf pH 5,2 gesenkt werden. Dadurch wird die Kontrolle des Agrobakterienwachstums verbessert.
- 5 • Die Zugabe von  $\text{AgNO}_3$  (3 bis 10 mg/l) zum Regenerationsmedium verbessert den Zustand der Kultur einschließlich der Regeneration selbst.
- 10 • Komponenten, die die Phenolbildung reduzieren und dem Fachmann bekannt sind, wie z.B. Zitronensäure, Ascorbinsäure, PVP u.v.a.m., wirken sich positiv auf die Kultur aus.
- 15 • Für das gesamte Verfahren kann auch flüssiges Kulturmedium Verwendung finden. Die Kultur kann auch auf handelsüblichen Trägern, die auf dem flüssigen Medium positioniert werden inkubiert werden.

Gemäß der oben beschriebenen Transformationsmethode wurden mit folgenden Expressionskonstrukten folgende Linien erhalten:

20

Mit pS5KETO2 wurde beispielsweise erhalten: cs18-1 und cs18-2, mit pS5AP3PKETO2 wurde beispielsweise erhalten: cs19-1, cs19-2 und cs19-3.

25 Beispiel 8

Charakterisierung der transgenen Pflanzenblüten

Beispiel 8.1

Trennung von Carotinoidestern in Blütenblättern transgener Pflanzen

30

Allgemeine Arbeitsvorschrift:

Die Blütenblätter der transgenen Pflanzen werden in flüssigem

- 35 Stickstoff gemörst und das Petalenpulver (etwa 40 mg) mit 100 % Aceton extrahiert (dreimal je 500  $\mu\text{l}$ ). Das Lösungsmittel wird evaporiert und die Carotinoide in 100 bis 200  $\mu\text{l}$  Petrolether/Aceton (5:1, v/v) resuspendiert.

- 40 Die Carotinoide werden in konzentrierter Form mittels Dünnschicht-Chromatographie (TLC) auf Silica60 F254- Platten (Merck) in einem organischen Laufmittel (Petrolether/Aceton; 5:1) entsprechend ihrer Phobizität aufgetrennt. Gelbe (Xanthophyllester), rote (Ketocarotinoidester) und orange Banden (Mischung aus Xanthophyll- und Ketocarotinoidestern) auf der TLC werden ausgekratzt.
- 45

## 133

Die an Silica gebundenen Carotinoide werden dreimal mit 500 µl Aceton eluiert, das Lösungsmittel evaporiert und die Carotinoide mittels HPLC aufgetrennt und identifiziert.

5 Mittels einer C30-reverse phase-Säule kann zwischen Mono- und Diestern der Carotinoide unterschieden werden. HPLC-Laufbedingungen waren nahezu identisch mit einer publizierten Methode (Frazer et al. (2000), Plant Journal 24(4): 551-558). Eine Identifizierung der Carotinoide ist aufgrund der UV-VIS-Spektren möglich.

10

Petalenmaterial der transgenen Tomatenpflanzen CS13-8, cs13-24, cs13-30, cs13-40, cs14-2, cs14-3, cs14-9, cs14-19 wurden gemörsert und mit Aceton extrahiert. Extrahierte Carotinoide wurden mittels TLC aufgetrennt. In beiden Linien konnten Mono- und

15 Diester von Ketocarotinoiden detektiert werden; die Monoester waren in deutlich geringerer Konzentration als die Diester vorhanden.

HPLC-Analysen ergaben, das Diester der Xanthophylle (gelbe Bande) 20 und der Ketocarotinoide (rote Bande) vorlagen; die Diester der Ketocarotinoide lagen in etwa 10mal höherer Konzentration vor als die Monoester (Abbildung 10).

Petalenmaterial der transgenen Tomatenpflanzen cs16-15, cs16-34, 25 cs16-35, cs16-40, die den AP3-Promotor tragen, wurden gemörsert und mit Aceton extrahiert. Extrahierte Carotinoide wurden mittels TLC aufgetrennt. Monoester von Ketocarotinoiden konnten nicht oder nur in äußerst geringer Konzentration nachgewiesen werden. Diester der Ketocarotinoide waren in gleicher Menge wie in Linien CS13 30 und CS14 vorhanden. Diester der Xanthophylle waren mengenmäßig wenig verändert im Vergleich zu Kontrollpflanzen.

Abbildung 9A zeigt ein Dünnschicht-Chromatogramm. Die Carotinoide aus Tomatenpetalen wurden mit Aceton extrahiert und mittels Dünnschicht-Chromatographie aufgetrennt. Im Vergleich zu Kontroll-Extrakten konnten zusätzliche Carotinoidbanden [(1), (2) und (3)] in 35 Petalen transgener Tomatenpflanzen detektiert werden.

Abbildung 10 zeigt ein HPLC-Diagramm. Die zusätzlichen Carotinoidbanden in Petalen transgener Tomatenfrüchte (siehe (1-3) in 40 Abbildung 9A) wurden extrahiert, mit Aceton eluiert und mittels HPLC analysiert. (1) wurde als Monoester, (2) und (3) wurden als Diester identifiziert.

## Beispiel 9

## Enzymatische Hydrolyse von Carotinoidestern und Identifizierung der Carotinoide

## 5 Allgemeine Arbeitsvorschrift

- Gemörsertes Petalenmaterial (50 bis 100 mg Frischgewicht) wird mit 100 % Aceton (dreimal 500 µl; jeweils etwa 15 Minuten schütteln) extrahiert. Das Lösungsmittel wird evaporiert. Carotinoide werden anschließend in 400 µl Aceton aufgenommen (Absorption bei 475 nm zwischen 0,75 und 1,25) und 5 min im Ultraschall-Bad behandelt. Der Carotinoid-Extrakt wird mit 300 µl 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,0) gemischt und 5 bis 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach erfolgt die Zugabe von 100 bis 200 µl Cholesterol-Esterase (Stammlösung: 6,8 units/ml einer Cholesterol-Esterase von *Pseudomonas spec.*). Nach 8 bis 12 Stunden wird nochmals 100 bis 200 µl Enzym zugegeben; Hydrolyse der Ester erfolgt innerhalb von 24 Stunden bei Inkubation bei 37°C. Nach Zugabe 0,35 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>·10H<sub>2</sub>O und 500 µl Petrolether wird gut gemischt und zentrifugiert (3 Minuten; 4500 g). Petrolether-Phase wird abgezogen und nochmals mit 0,35 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>·10H<sub>2</sub>O (anhydrous) gemischt. Zentrifugation für 1 Minute bei 10000 g. Petrolether wird evaporiert und freie Carotinoide werden in 100 bis 120 µl Aceton aufgenommen. Mittels HPLC und C30-reverse phase-Säule können freie Carotinoide aufgrund von Retentionszeit und UV-VIS-Spektren identifiziert werden.

- Isolierte Ketocarotinoidester (Mono- und Diester) der Linien CS13, CS14 und CS16 wurden mit Cholesterol-Esterase hydrolysiert und die freigesetzten Carotinoide mittels HPLC aufgetrennt. Identifizierung der Carotinoide erfolgte aufgrund von Retentionszeit und Spektrum im Vergleich zu Carotinoid-Standards. Mono- und Diester enthalten Astaxanthin in hoher Konzentration (90%) und Adonixanthin in geringer Konzentration (10%). (siehe Tabelle und Abbildungen)

- Abbildung 11 zeigt ein HPLC-Diagramm. Die eluierten Ester aus Beispiel 9 (Abbildung 10) wurden enzymatisch hydrolysiert und die Hydrolyseprodukte mittels HPLC analysiert. Sowohl Mono- als auch Diester enthalten Astaxanthin als Hauptcarotinoid sowie Adonixanthin in geringer Konzentration.



Beispiel 10:

Herstellung eines Klonierungsvektors zur Herstellung von Inverted-Repeat-Expressionskassetten für die blütenspezifischen Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta*

- 5 Die Expression von Inverted-Repeat Transkripten bestehend aus Fragmenten der Epsilon-Cyclase in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blütenspezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis thaliana* (AL132971: Nukleotidregion 10 9298 bis 10200; Hill et al. (1998) Development 125: 1711 bis 1721).

- 15 Das Inverted-Repeat Transkript enthält jeweils ein Fragment in korrekter Orientierung (Sense-Fragment) und ein sequenzidentisches Fragment in entgegengesetzter Orientierung (Antisense-Fragment), die durch ein funktionelles Intron, das PIV2 Intron des ST-LH1 Genes aus Kartoffel (Vancanneyt G. et al. (1990) Mol Gen Genet 220: 245-50) mit einander verbunden sind.

- 20 Die cDNA, die für den AP3 Promoter (-902 bis +15) aus *Arabidopsis thaliana* kodiert, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethode aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) und der Primer PR7 (SEQ ID NO: 49) und PR10 (SEQ ID NO: 52) hergestellt.

- 25 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

- Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das AP3-Promoterfragment (-902 bis +15) kodiert, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, 30 in dem enthalten war:

- 1 µl genomischer DNA aus *A.thaliana* (1:100 verd hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 35 - 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 49)
- 0.2 mM PR10 (SEQ ID NO: 52)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

- 40 Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

	1X	94°C	2 Minuten
	35X	94°C	1 Minute
45		50°C	1 Minute
		72°C	1 Minute
	1X	72°C	10 Minuten

## 136

Das 922 Bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pTAP3 erhalten. Sequenzierung des Klons pTAP3 bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in durch eine Insertion  
 5 (ein G in Position 9765 der Sequenz AL132971) und einen Basenaustausch (ein G statt ein A in Position 9726 der Sequenz AL132971) von der publizierten AP3 Sequenz (AL132971, Nukleotidregion 9298 bis 10200) unterscheidet (Position 33: T statt G, Position 55: T statt G). Diese Nukleotidunterschiede wurden in einem unabhängigen  
 10 Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die Nukleotidsequenz in der verwendeten *Arabidopsis thaliana* Pflanze.

Die modifizierte Version AP3P wurde mittels rekombinanter PCR  
 15 unter Verwendung des Plasmids pTAP3 hergestellt. Die Region 10200 bis 9771 wurde mit den Primern PR7 (SEQ ID NO: 49) und Primern PR9 (SEQ ID NO: 51) amplifiziert (Amplifikat A7/9), die Region 9526 bis 9285 wurde mit den PR8 (SEQ ID NO: 50) und PR10 (SEQ ID NO: 52) amplifiziert (Amplifikat A8/10).

20 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der DNA-Fragmente, die für die Regionen Region 10200 bis 9771 und 9526 bis 9285 des AP3  
 25 Promoters kodieren, erfolgte in 50 µl Reaktionsansätzen, in denen enthalten war:

- 100 ng AP3 Amplifikat (oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 30 - 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 49) bzw. PR8 (SEQ ID NO: 50)
- 0.2 mM PR9 (SEQ ID NO: 51) bzw. PR10 (SEQ ID NO: 52)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

35 Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

	1X	94°C	2 Minuten
	35X	94°C	1 Minute
40		50°C	2 Minuten
		72°C	3 Minuten
	1X	72°C	10 Minuten

Die rekombinante PCR beinhaltet Annealing der sich über eine  
 45 Sequenz von 25 Nukleotiden überlappenden Amplifikate A7/9 und A8/10, Vervollständigung zu einem Doppelstrang und anschließende Amplifizierung. Dadurch entsteht eine modifizierte Version des

137

AP3 Promoters, AP3P, in dem die Positionen 9670 bis 9526 deletiert sind. Die Denaturierung (5 min bei 95°C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40°C) beider Amplifikate A7/9 und A8/10 erfolgte in einem 17,6 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 0.5 µg A7/9
- 0.25 µg A8/10

10 Das Auffüllen der 3'Enden (30 min bei 30°C) erfolgte in einem 20 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 17.6 µl A7/9 und A8/10-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)

- 15 - 50 µM dNTPs
- 2 µl 1X Klenow Puffer
- 2U Klenow Enzym

Die Nukleinsäure kodierend für die modifizierte Promoterversion AP3P wurde mittels PCR unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR7 SEQ ID NO: 49) und eines antisense spezifischen Primers (PR10 SEQ ID NO: 52) amplifiziert.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

25 Die PCR zur Amplifikation des AP3P Fragmentes erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 30 - 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 49)
- 0.2 mM PR10 (SEQ ID NO: 52)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 35 - 28.8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

	1X	94°C	2 Minuten
	35X	94°C	1 Minute
40		50°C	1 Minuten
		72°C	1 Minuten
	1X	72°C	10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit PR7, SEQ ID NO: 49 und PR10 SEQ ID NO: 52 resultierte in einem 778 Bp Fragment das für die modifizierte Promoterversion AP3P kodiert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequen-

zierungen mit den Primern T7 und M13 bestätigten eine zur Sequenz AL132971, Region 10200 bis 9298 identische Sequenz, wobei die interne Region 9285 bis 9526 deletiert wurde. Diese Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Gueri-  
 5 neu et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 771 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus pTAP3P und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter AP3P anstelle  
 10 des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJAP3P.

Ein DNA-Fragment, das das PIV2 Intron des Gens ST-LS1 enthält wurde mittels PCR unter Verwendung von Plasmid-DNA p35SGUS INT (Vancanneyt G. et al. (1990) Mol Gen Genet 220: 245-50) sowie der  
 15 Primer PR40 (Seq ID NO: 54) und Primer PR41 (Seq ID NO: 55) hergestellt.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

20 Die PCR zur Amplifikation der Sequenz des Intron PIV2 des Gens ST-LS1, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl p35SGUS INT
- 25 - 0.25 mM dNTPs
- 0.2 µM PR40 (SEQ ID NO: 54)
- 0.2 µM PR41 (SEQ ID NO: 55)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 30 - 28.8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35 35X	94°C	1 Minute
	53°C	1 Minuten
	72°C	1 Minuten
1X	72°C	10 Minuten

40 Die PCR-Amplifikation mit PR40 und PR41 resultierte in einem 206 Bp-Fragment. Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pBluntII (Invitrogen) kloniert und der Klon pBluntII-40-41 erhalten. Sequenzierungen dieses Klons mit dem Primer SP6 bestätigte eine Sequenz, die  
 45 identisch ist mit der entsprechenden Sequenz aus dem Vektor p35SGUS INT.

Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Vektor pJAP3P (oben beschrieben).

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 206 Bp SalI-BamHI  
 5 Fragmentes aus pBluntII-40-41 und Ligierung mit dem SalI-BamHI  
 geschnittenen Vektor pJAP3P. Der Klon, der das Intron PIV2 des  
 Gens ST-LS1 in der korrekten Orientierung anschließend an das  
 3' Ende des *rbcs* Transitpeptides enthält, heisst pJA11 und ist ge-  
 eignet, Expressionskassetten für die blütenspezifische Expression  
 10 von Inverted-Repeat Transkripten herzustellen.

In der Abbildung 12 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten  
 AP3P Promoter (771 bp), Fragment *rbcs* das *rbcs* Transitpeptid aus  
 Erbse (204 bp), Fragment *intron* das Intron PIV2 des Kartoffel-  
 15 Gens ST-LS1, und Fragment *term* (761 Bp) das Polyadenylierungs-  
 signal von CaMV.

#### Beispiel 11

Herstellung von Inverted-Repeat-Expressionskassetten für die  
 20 blütenspezifische Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in  
*Tagetes erecta* (gerichtet gegen die 5' Region der Epsilon-Cyclase  
 cDNA)

Die Nukleinsäure, die die 5' terminale 435bp Region der Epsilon-  
 25 Cyclase cDNA (Genbank accession NO: AF251016) enthält, wurde  
 mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Tagetes erecta*  
 cDNA unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR42  
 SEQ ID NO: 56) und eines antisense spezifischen Primers (PR43  
 SEQ ID NO: 57) amplifiziert. Die 5' terminale 435 bp Region der  
 30 Epsilon-Cyclase cDNA aus *Tagetes erecta* setzt sich zusammen aus  
 138 bp 5' Nicht-translatierter Sequenz (5'UTR) und 297 bp der dem  
 N-Terminus entsprechenden kodierenden Region.

Für die Präparation von Total-RNA aus Blüten von *Tagetes* wurden  
 35 100mg der gefrorenen, pulverisierten Blüten in ein Reaktionsgefäß  
 überführt und in 0,8 ml Trizol-Puffer (LifeTechnologies) aufge-  
 nommen. Die Suspension wurde mit 0,2 ml Chloroform extrahiert.  
 Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 12000 g wurde der wässrige  
 Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt  
 40 und mit einem Volumen Ethanol extrahiert. Die RNA wurde mit einem  
 Volumen Isopropanol gefällt, mit 75 % Ethanol gewaschen und das  
 Pellet in DEPC Wasser (über Nacht Inkubation von Wasser mit  
 1/1000 Volumen Diethylpyrocarbonat bei Raumtemperatur, anschlie-  
 ßend autoklaviert) gelöst. Die RNA-Konzentration wurde photome-  
 45 trisch bestimmt. Für die cDNA-Synthese wurden 2.5 ug Gesamt-RNA  
 für 10 min bei 60°C denaturiert, für 2 min auf Eis abgekühlt und  
 mittels eines cDNA-Kits (Ready-to-go-you-prime-beads, Pharmacia

## 140

Biotech) nach Herstellerangaben unter Verwendung eines antisense spezifischen Primers (PR17 SEQ ID NO: 53) in cDNA umgeschrieben.

Die Bedingungen der anschließenden PCR-Reaktionen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR42-PR43 DNA-Fragmentes, das die 5'terminale 435bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

10

- 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 µM PR42 (SEQ ID NO: 56)
- 0.2 µM PR43 (SEQ ID NO: 57)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 µl Aq. Dest.

15

Die PCR zur Amplifikation des PR44-PR45 DNA-Fragmentes, das die 5'terminale 435 bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

20

- 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 µM PR44 (SEQ ID NO: 58)
- 0.2 µM PR45 (SEQ ID NO: 59)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 µl Aq. Dest.

30

Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35 35X	94°C	1 Minute
	58°C	1 Minuten
	72°C	1 Minuten
1X	72°C	10 Minuten

35

Die PCR-Amplifikation mit Primer PR42 und PR43 resultierte in einem 443 Bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit Primer PR44 und PR45 resultierte in einem 444 Bp-Fragment.

40

Die beiden Amplifikate, das PR42-PR43 (HindIII-SalI sense) Fragment und das PR44-PR45 (EcoRI-BamHI antisense) Fragment, wurden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit dem

45

## 141

Primer SP6 bestätigten jeweils eine zur publizierte Sequenz AF251016 (SEQ ID NO: 38) identische Sequenz abgesehen von den eingeführten Restriktionsstellen. Diese Klon wurde daher für die Herstellung eines Inverted-Repeat Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJAI1 (siehe Beispiel 10) verwendet.

Der erste Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 444 Bp PR44-PR45 BamHI-EcoRI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJAI1. Der Klon, der 5'terminale Region der Epsilon-Cyclase in der antisense Orientierung enthält, heisst pJAI2. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem antisense Fragment der 5'terminale Region der Epsilon-Cyclase und dem Polyadenylierungssignal aus CaMV.

Der zweite Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 443 Bp PR42-PR43 HindIII-SalI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem HindIII-SalI geschnittenen Vektor pJAI2. Der Klon, der 435 bp 5'terminale Region der Epsilon-Cyclase cDNA in der sense Orientierung enthält, heisst pJAI3. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem AP3P und dem sense Fragment der 5'terminale Region der Epsilon-Cyclase.

Für die Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle des CHRC-Promoters wurde ein CHRC-Promoterfragment unter Verwendung genomischer DNA aus Petunie (nach Standardmethoden hergestellt) sowie der Primer PRCHRC5 (SEQ ID NO: 76) und PRCHRC3 (SEQ ID NO: 77) amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen des resultierenden Klons pCR2.1-CHRC mit den Primern M13 und T7 bestätigten eine zur Sequenz AF099501 identische Sequenz. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJAI3 verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1537 bp SacI-HindIII Fragments aus pCR2.1-CHRC und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJAI3. Der Klon, der den Promoter CHRC anstelle des ursprünglichen Promoters AP3P enthält heisst pJCI3.

Die Herstellung der Expressionsvektoren für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der AP3P- bzw. CHRC-kontrollierten Inverted-Repeat Transkripts in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

## 142

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AI3 wurde das 2622 bp SacI-XhoI Fragment aus pJAI3 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 13, Konstruktkarte).

- 5 In der Abbildung 13 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment 5sense die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in Sense-Orientierung, Fragment intron das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment 5anti die 5'Region der Epsilon-cyclase aus *Tagetes erecta*  
 10 (435 bp) in antisense Orientierung, und Fragment term (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

- Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5CI3 wurde das 3394 bp SacI-XhoI Fragment aus pJCI3 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 14, Konstruktkarte).

- In der Abbildung 14 beinhaltet Fragment CHRC den Promoter (1537 bp), Fragment 5sense die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in Sense-Orientierung, Fragment intron das Intron  
 20 PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment 5anti die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in Antisense-Orientierung, und Fragment term (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

## 25 Beispiel 12

Herstellung einer Inverted-Repeat-Expressionskassette für die blütenspezifische Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta* (gerichtet gegen die 3'Region der Epsilon-Cyclase cDNA)

30

- Die Nukleinsäure, die die 3'terminale Region (384 bp) der Epsilon-Cyclase cDNA (Genbank accession NO: AF251016) enthält wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Tagetes erecta* cDNA unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR46  
 35 SEQ ID NO: 60) und eines antisense spezifischen Primers (PR47 SEQ ID NO: 61) amplifiziert. Die 3'terminale Region (384 bp) der Epsilon-Cyclase cDNA aus *Tagetes erecta* setzt sich zusammen aus 140 bp 3'-Nicht-translatierter Sequenz (3'UTR) und 244 bp der dem C-Terminus entsprechenden kodierenden Region.

40

Die Präparation von Total-RNA aus Blüten von *Tagetes* erfolgte wie unter Beispiel 11 beschrieben.

- Die cDNA Synthese erfolgte wie unter Beispiel 11 unter Verwendung  
 45 des antisense spezifischen Primers PR17 (SEQ ID NO: 53) beschrieben.



## 143

Die Bedingungen der anschließenden PCR-Reaktionen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR46-PR457 DNA-Fragmentes, das die 3'terminale 384 bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 10 - 0.2 µM PR46 (SEQ ID NO: 60)
- 0.2 µM PR47 (SEQ ID NO: 61)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 µl Aq. Dest.

15 Die PCR zur Amplifikation des PR48-PR49 DNA-Fragmentes, das die 5'terminale 384 bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 20 - 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 µM PR48 (SEQ ID NO: 62)
- 0.2 µM PR49 (SEQ ID NO: 63)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 25 - 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 µl Aq. Dest.

Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

30	1X	94°C	2 Minuten
	35X	94°C	1 Minute
		58°C	1 Minuten
		72°C	1 Minuten
35	1X	72°C	10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 60 und SEQ ID NO: 61 resultierte in einem 392 Bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 62 und SEQ ID NO: 63 resultierte in einem 396 Bp-Fragment.

Die beiden Amplifikate, das PR46-PR47 Fragment und das PR48-PR49 Fragment, wurden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit dem Primer SP6 bestätigten jeweils eine zur publizierten Sequenz AF251016 (SEQ ID NO: 38) identische Sequenz abgesehen von den eingeführten Restriktionsstellen. Diese Klone wurde

daher für die Herstellung eines Inverted-Repeat Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJAI1 (siehe Beispiel 10) verwendet.

Der erste Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 396 Bp  
 5 PR48-PR49 BamHI-EcoRI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-  
 BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-EcoRI geschnit-  
 tenen Vektor pJAI1. Der Klon, der 3'terminale Region der Epsilon-  
 Cyclase in der antisense Orientierung enthält, heisst pJAI4.  
 Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwi-  
 10 schen dem Antisense-Fragment der 3'terminale Region der Epsilon-  
 Cyclase und dem Polyadenylierungssignal aus CaMV.

Der zweite Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 392  
 Bp PR46-PR47 HindIII-SalI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor  
 15 pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem HindIII-SalI ge-  
 schnittenen Vektor pJAI4. Der Klon, der 392 bp 3'terminale Region  
 der Epsilon-Cyclase cDNA in der sense Orientierung enthält,  
 heisst pJAI5. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle  
 Fusion zwischen dem AP3P und dem Sense-Fragment 3'terminale Re-  
 20 gion der Epsilon-Cyclase.

Die Herstellung eines Expressionsvektors für die Agrobacterium-  
 vermittelte Transformation des AP3P-kontrollierten Inverted-Re-  
 peat Transkripts in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung  
 25 des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900). Zur Herstellung des Ex-  
 pressionsvektors pS5AI5 wurde das 2523 bp SacI-XhoI Fragment aus  
 pJAI5 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Ab-  
 bildung 15, Konstruktkarte).

30 In der Abbildung 15 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten  
 AP3P Promoter (771 bp), Fragment 3sense die 3'region der Epsilon  
 cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in sense Orientierung, Frag-  
 ment intron das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment  
 3anti die 3'region der Epsilon cyclase aus *Tagetes erecta* (435  
 35 bp) in antisense Orientierung, und Fragment term (761 Bp) das Po-  
 lyadenylierungssignal von CaMV.

### Beispiel 13

#### Klonierung des Epsilon-Cyclase Promoters

40

Ein 199 bp Fragment bzw. das 312 bp Fragment des Epsilon-Cyclase  
 Promoters wurde durch zwei unabhängige Klonierungsstrategien, In-  
 verse PCR (adaptiert Long et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA 90:  
 10370) und TAIL-PCR (Liu Y-G. et al. (1995) Plant J. 8: 457-463)  
 45 unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethode aus *Tage-  
 tes erecta*, Linie Orangenprinz, isoliert) isoliert.

## 145

Für den Inverse PCR-Ansatz wurden 2 µg genomische DNA in einem 25 µl Reaktionsansatz mit EcoRV und RsaI verdaut, anschließend auf 300 µl verdünnt und über Nacht bei 16°C mit 3U Ligase religiert. Unter Verwendung der Primer PR50 (SEQ ID NO: 64) und PR51 (SEQ ID NO: 65) wurde durch PCR Amplifikation ein Fragment hergestellt, das, jeweils in Sense-Orientierung, 354 bp der Epsilon-Cyclase cDNA (Genbank Accession AF251016), ligiert an 300 bp des Epsilon-Cyclase Promoters sowie 70 bp des 5'terminalen Bereichs der cDNA Epsilon-Cyclase enthält (siehe Abbildung 16).

10

Die Bedingungen der PCR-Reaktionen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR50-PR51 DNA-Fragmentes, das unter anderem das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl Ligationsansatz (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 µM PR50 (SEQ ID NO: 64)
- 20 - 0.2 µM PR51 (SEQ ID NO: 65)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 µl Aq. Dest.

25 Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

30	1X	94°C	2 Minuten
	35X	94°C	1 Minute
		53°C	1 Minute
		72°C	1 Minute
	1X	72°C	10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit Primer PR50 und PR51 resultierte in einem 734 Bp-Fragment, das unter anderem das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält (Abbildung 16).

Das Amplifikat, wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern M13 und T7 ergaben die Sequenz SEQ ID NO: 45. Diese Sequenz wurde in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz in der verwendeten *Tagetes erecta* Linie Orangenprinz.

45

## 146

Für den TAIL-PCR Ansatz wurden drei sukzessive PCR-Reaktionen mit jeweils unterschiedlichen gen-spezifischen Primern (nested primers) durchgeführt.

5 Die TAIL1-PCR erfolgte in einem 20 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ng genomische DNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.2 mM jedes dNTPs
- 10 - 0.2 µM PR60 (SEQ ID NO: 66)
- 0.2 µM AD1 (SEQ ID NO: 69)
- 2 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.5 U R Taq Polymerase (TAKARA)
- mit Aq. Dest. auf 20 µl aufgefüllt

15

- AD1 stellte dabei zunächst eine Mischung aus Primern der Sequenzen (a/c/g/t)tcga(g/c)t(a/t)t(g/c)g(a/t)gtt dar.

Die PCR-Reaktion TAIL1 wurden unter folgenden Zyklusbedingungen  
20 durchgeführt:

- 1X 93°C: 1 Minute, 95°C: 1 Minute
- 5X 94°C: 30 Sekunden, 62°C: 1 Minute, 72°C: 2.5 Minuten
- 1X 94°C: 30 Sekunden, 25°C: 3 Minuten, ramp to 72°C in 3 Minuten,
- 25 72°C: 2.5 Minuten
- 15X 94°C: 10 Sekunden, 68°C: 1 Minute, 72°C: 2.5 Minuten;
- 94°C: 10 Sekunden, 68°C: 1 Minute, 72°C: 2.5 Minuten;
- 94°C: 10 Sekunden, 29°C: 1 Minute, 72°C: 2.5 Minuten
- 1X 72°C: 5 Minuten

30

Die TAIL2-PCR erfolgte in einem 21 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl einer 1:50 Verdünnung des TAIL1-Reaktionsansatzes (herges-
- 35 tellt wie oben beschrieben)
- 0.8 mM dNTP
- 0.2 µM PR61 (SEQ ID NO: 67)
- 0.2 µM AD1 (SEQ ID NO: 69)
- 2 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 40 - 0.5 U R Taq Polymerase (TAKARA)
- mit Aq. Dest. auf 21 µl aufgefüllt

147

Die PCR-Reaktion TAIL2 wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 12X 94°C: 10 Sekunden, 64°C: 1 Minute, 72°C: 2.5 Minuten;
- 5 94°C: 10 Sekunden, 64°C: 1 Minute, 72°C: 2.5 Minuten;
- 94°C: 10 Sekunden, 29°C: 1 Minute, 72°C: 2.5 Minuten
- 1X 72°C: 5 Minuten

Die TAIL3-PCR erfolgte in einem 100 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl einer 1:10 Verdünnung des TAIL2-Reaktionsansatzes (hergestellt wie oben beschrieben)
- 15 - 0.8 mM dNTP
- 0.2 µM PR63 (SEQ ID NO: 68)
- 0.2 µM AD1 (SEQ ID NO: 69)
- 10 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.5 U R Taq Polymerase (TAKARA)
- 20 - mit Aq. Dest. auf 100 µl aufgefüllt

Die PCR-Reaktion TAIL3 wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 25 20X 94°C: 15 Sekunden, 29°C: 30 Sekunden, 72°C: 2 Minuten
- 1X 72°C: 5 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit Primer PR63 und AD1 resultierte in einem 280 Bp-Fragment, das unter anderem das 199 bp Promoter-fragment der Epsilon-Cyclase enthält (Abbildung 17).

Das Amplifikat, wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern M13 und T7 ergaben die Sequenz

35 SEQ ID NO: 46. Diese Sequenz ist identisch mit der Sequenz SEQ ID NO: 45, die mit der IPCR Strategie isoliert wurde und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz in der verwendeten *Tagetes erecta* Linie Orangenprinz.

40 Der pCR2.1-Klon, der das 312 bp Fragment (SEQ ID NO: 45) des Epsilon-Cyclase Promoters, das durch die IPCR-Strategie isoliert wurde, enthält, heisst pTA-ecycP und wurde für die Herstellung der IR Konstrukte verwendet.

## Beispiel 14

Herstellung einer Inverted-Repeat-Expressionskassette für die blütenspezifische Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta* (gerichtet gegen die Promoterregion der Epsilon-Cyclase cDNA).

Die Expression von Inverted-Repeat Transkripten bestehend aus Promoterfragmenten der Epsilon-cyclase in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blütenspezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis* (siehe Beispiel 10) oder des blütenspezifischen Promoters CHRC (Genbank accession NO: AF099501). Das Inverted-Repeat Transkript enthält jeweils ein Epsilon-Cyclase-Promoterfragment in korrekter Orientierung (Sense-Fragment) und ein sequenzidentisches Epsilon-Cyclase-Promoterfragment in entgegengesetzter Orientierung (Antisense-Fragment), die durch ein funktionelles Intron (siehe Beispiel 10) mit einander verbunden sind.

Die Promoterfragmente wurde mittels PCR unter Verwendung von Plasmid-DNA (Klon pTA-ecycP, siehe Beispiel 13 ) und der Primer PR124 (SEQ ID NO: 70) und PR126 (SEQ ID NO: 72) bzw. der Primer PR125 (SEQ ID NO: 71) und PR127 (SEQ ID NO: 73) hergestellt.

Die Bedingungen der PCR-Reaktionen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR124-PR126 DNA-Fragmentes, das das Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 µM PR124 (SEQ ID NO: 70)
- 0.2 µM PR126 (SEQ ID NO: 72)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 µl Aq. Dest.

Die PCR zur Amplifikation des PR125-PR127 DNA-Fragmentes, das das 312bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 µM PR125 (SEQ ID NO: 71)
- 0.2 µM PR127 (SEQ ID NO: 73)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)

- 28.8 µl Aq. Dest.

Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

5			
	1X	94°C	2 Minuten
	35X	94°C	1 Minute
		53°C	1 Minuten
		72°C	1 Minuten
10	1X	72°C	10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit Primer PR124 und PR126 resultierte in einem 358 Bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit Primer PR125 und PR127 resultierte in einem 361 Bp-Fragment.

15 Die beiden Amplifikate, das PR124-PR126 (HindIII-SalI sense) Fragment und das PR125-PR127 (EcoRI-BamHI antisense) Fragment, wurden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen  
20 mit dem Primer SP6 bestätigten jeweils eine Sequenz, die abgesehen von den eingeführten Restriktionsstellen identisch ist zu SEQ ID NO: 45. Diese Klonen wurden daher für die Herstellung eines Inverted-Repeat Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJAI1 (siehe Beispiel 10) verwendet.

25 Der erste Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 358 Bp PR124-PR126 HindIII-SalI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJAI1. Der Klon, das Epsilon-Cyclase Promoter-  
30 fragment in der sense Orientierung enthält, heisst cs43. Durch die Ligation wird das Sense-Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters zwischen den AP3P Promoter und das Intron eingefügt.

Der zweite Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 361Bp  
35 PR125-PR127 BamHI-EcoRI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor cs43. Der Klon, der das Epsilon-Cyclase Promoterfragment in der antisense Orientierung enthält, heisst cs44. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem Intron  
40 und dem Antisense-Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters.

Für die Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle des CHRC-Promoters wurde ein CHRC-Promoterfragment unter Verwendung genomischer DNA aus Petunie (nach Standard-  
45 methoden hergestellt) sowie der Primer PRCHRC3' (SEQ ID NO: 77) und PRCHRC5' (SEQ ID NO: 76) amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzie-

## 150

rungen des resultierenden Klons pCR2.1-CHRC mit den Primern M13 und T7 bestätigten eine zur Sequenz AF099501 identische Sequenz. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor cs44 verwendet.

5

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1537 bp SacI-HindIII Fragments aus pCR2.1-CHRC und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor cs44. Der Klon, der den Promoter CHRC anstelle des ursprünglichen Promoters AP3P enthält heisst cs45.

10

Für die Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle zweier Promotoren, des CHRC-Promoter und des AP3P-Promoters, wurde der AP3P-Promoter in antisense Orientierung an den 3'Terminus des Epsilon-Cyclase antisense Fragmentes in cs45 kloniert. Das AP3P-Promoterfragments aus pJAI1 wurde unter Verwendung der Primer PR128 und PR129 amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Die Sequenzierung mit den Primern M13 und T7 bestätigten eine zur Sequenz SEQ ID NO: 28 (AL132971) identische Sequenz. Dieser Klon pCR2.1-AP3PSX wurde für Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle zweier Promotoren verwendet.

15

20

25

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 771 bp SalI-XhoI Fragments aus pCR2.1-AP3PSX und Ligierung in den XhoI geschnittenen Vektor cs45. Der Klon, der 3'seitig des Inverted Repeats, den Promoter AP3P in antisense Orientierung enthält heisst cs46.

30

Die Herstellung der Expressionsvektoren für die Agrobacterium-vermittelte Transformation des AP3P-kontrollierten Inverted-Repeat Transkripts in Tagetes erecta erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

35

40

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AI7 wurde das 1685bp SacI-XhoI Fragment aus cs44 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 18, Konstruktkarte). In der Abbildung 18 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment P-sense das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in sense Orientierung, Fragment intron das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1), und Fragment P-anti das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in antisense Orientierung.

45

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5CI7 wurde das 2445bp SacI-XhoI Fragment aus cs45 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 19, Konstruktkarte).



## 151

In der Abbildung 19 beinhaltet Fragment *CHRC* den *CHRC*-Promoter (1537 bp), Fragment *P-sense* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in sense Orientierung, Fragment *intron* das Intron IV2 des Kartoffel-Gens *ST-LS1*), und Fragment *P-anti* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in antisense Orientierung.

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5CAI7 wurde das 3219bp *SacI*-*XhoI* Fragment aus cs46 mit dem *SacI*-*XhoI* geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 20, Konstruktkarte)

10

In der Abbildung 20 beinhaltet Fragment *CHRC* den *CHRC*-Promoter (1537 bp), Fragment *P-sense* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in sense Orientierung, Fragment *intron* das Intron IV2 des Kartoffel-Gens *ST-LS1*), Fragment *P-anti* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in antisense Orientierung und das Fragment *AP3P* das 771 bp *AP3P*-Promoterfragment in antisense Orientierung.

## Beispiel 15

20 Herstellung transgener *Tagetes* Pflanzen mit reduzierter  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität

*Tagetessamen* werden sterilisiert und auf Keimungsmedium (MS-Medium; Murashige and Skoog, *Physiol. Plant.* 15(1962), 473-497)

25 pH 5,8, 2 % Saccharose) aufgelegt. Die Keimung erfolgt in einem Temperatur/Licht/Zeitintervall von 18 bis 28°C / 20 bis 200  $\mu$ E / 3 bis 16 Wochen, bevorzugt jedoch bei 21°C, 20 bis 70  $\mu$ E, für 4 bis 8 Wochen.

30 Alle Blätter der sich bis dahin entwickelten *in vitro* Pflanzen werden geerntet und quer zur Mittelrippe geschnitten. Die dadurch entstehenden Blattexplantate mit einer Größe von 10 bis 60 mm<sup>2</sup> werden im Verlaufe der Präparation in flüssigem MS-Medium bei Raumtemperatur für maximal 2 h aufbewahrt.

35

Der Agrobakterium *tumefaciens* Stamm EHA105 wurde mit dem Binärplasmid pS5AI3 transformiert. Die Anzucht des transformierten *A. tumefaciens* Stammes EHA105 erfolgte über Nacht unter folgenden Bedingungen: Eine Einzelkolonie wurde in YEB (0,1 % Hefeextrakt,

40 0,5 % Rindfleischextrakt, 0,5 % Pepton, 0,5 % Saccharose, 0,5 % Magnesiumsulfat x 7 H<sub>2</sub>O) mit 25 mg/l Kanamycin angeimpft und bei 28°C für 16 bis 20 h angezogen. Anschließend wurde die Bakterien-suspension durch Zentrifugation bei 6000 g für 10 min geerntet und derart in flüssigem MS Medium resuspendiert, das eine OD<sub>600</sub>

45 von ca. 0,1 bis 0,8 entstand. Diese Suspension wurde für die Co-Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet.

- Unmittelbar vor der Co-Kultivierung wird das MS-Medium, in dem die Blätter aufbewahrt worden sind, durch die Bakteriensuspension ersetzt. Die Inkubation der Blättchen in der Agrobakteriensuspension erfolgte für 30 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur. Anschließend werden die infizierten Explantate auf ein mit Agar (z.B. 0,8 % Plant Agar (Duchefa, NL) verfestigtes MS-Medium mit Wachstumsregulatoren, wie beispielsweise 3 mg/l Benzylaminopurin (BAP) sowie 1 mg/l Indolyllessigsäure (IAA) aufgelegt. Die Orientierung der Blätter auf dem Medium ist bedeutungslos. Die Kultivierung der Explantate findet für 1 bis 8 Tage, bevorzugt aber für 6 Tage statt, dabei können folgende Bedingungen angewendet werden: Lichtintensität: 30 bis 80  $\mu\text{Mol/m}^2 \times \text{sec}$ , Temperatur: 22 bis 24°C, hell/dunkel Wechsel von 16/8 Stunden. Anschließend werden die co-kultivierten Explantate auf frisches MS-Medium, bevorzugt mit den gleichen Wachstumsregulatoren übertragen, wobei dieses zweite Medium zusätzlich ein Antibiotikum zur Unterdrückung des Bakterienwachstums enthält. Timentin in einer Konzentration von 200 bis 500 mg/l ist für diesen Zweck sehr geeignet. Als zweite selektive Komponente wird eine für die Selektion des Transformationserfolges eingesetzt. Phosphinothricin in einer Konzentration von 1 bis 5 mg/l selektiert sehr effizient, aber auch andere selektive Komponenten gemäß des zu verwendenden Verfahrens sind denkbar.
- Nach jeweils ein bis drei Wochen erfolgt der Transfer der Explantate auf frisches Medium bis sich Sprossknospen und kleine Sprosse entwickeln, die dann auf das gleiche Basalmedium einschließlich Timentin und PPT oder alternative Komponenten mit Wachstumsregulatoren, nämlich z.B. 0,5 mg/l Indolylbuttersäure (IBA) und 0,5 mg/l Gibberillinsäure  $\text{GA}_3$ , zur Bewurzelung übertragen werden. Bewurzelte Sprosse können ins Gewächshaus überführt werden.
- Zusätzlich zu der beschriebenen Methode sind folgende vorteilhafte Modifikationen möglich:
- Bevor die Explantate mit den Bakterien infiziert werden, können sie für 1 bis 12 Tage, bevorzugt 3 bis 4, auf das oben beschriebene Medium für die Co-Kultur vorinkubiert werden. Anschließend erfolgt die Infektion, Co-Kultur und selektive Regeneration wie oben beschrieben.
  - Der pH Wert für die Regeneration (normalerweise 5,8) kann auf pH 5,2 gesenkt werden. Dadurch wird die Kontrolle des Agrobakterienwachstums verbessert.

- Die Zugabe von  $\text{AgNO}_3$  (3 - 10 mg/l) zum Regenerationsmedium verbessert den Zustand der Kultur einschließlich der Regeneration selbst.
- 5 • Komponenten, die die Phenolbildung reduzieren und dem Fachmann bekannt sind, wie z.B. Zitronensäure, Ascorbinsäure, PVP u.v.a.m., wirken sich positiv auf die Kultur aus.
- 10 • Für das gesamte Verfahren kann auch flüssiges Kulturmedium Verwendung finden. Die Kultur kann auch auf handelsüblichen Trägern, die auf dem flüssigen Medium positioniert werden inkubiert werden.

15 Gemäß der oben beschriebenen Transformationsmethode wurden mit dem Expressionskonstrukt pS5AI3 folgende Linien erhalten:

CS30-1, CS30-3 und CS30-4

20 Beispiel 16:  
Charakterisierung der transgenen Tagetes Pflanzen mit reduzierter  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität

25 Das Blütenmaterial der transgenen Tagetes erecta Pflanzen aus Beispiel 15 wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert und das Pulver (etwa 250 bis 500 mg) mit 100 % Aceton extrahiert (dreimal je 500  $\mu\text{l}$ ). Das Lösungsmittel wurde evaporiert und die Carotinoide in 100  $\mu\text{l}$  Aceton resuspendiert.

30 Mittels einer C30-reverse phase-Säule konnten die individuellen Carotinoide quantifiziert werden. Die HPLC-Laufbedingungen waren nahezu identisch mit einer publizierten Methode (Frazer et al. (2000), Plant Journal 24(4): 551-558). Eine Identifizierung der Carotinoide war aufgrund der UV-VIS-Spektren möglich.

35 Tabelle 2 zeigt das Carotinoidprofil in Tagetespetalen der gemäß der vorstehend beschriebenen Beispiele hergestellten transgenen Tagetes- und Kontrolltagetespflanzen. Alle Carotinoidmengen sind in [ $\mu\text{g/g}$ ] Frischgewicht angegeben, prozentuale Veränderungen gegenüber der Kontrollpflanze sind in Klammern angegeben.

40 Im Vergleich zur genetisch nicht veränderten Kontrollpflanze, weisen die genetisch veränderten Pflanzen mit reduzierter epsilon-Cyclase-Aktivität einen deutlich erhöhten Gehalt an Carotinoiden des " $\beta$ -Carotin-Weges", wie beispielsweise  $\beta$ -Carotin und Zeaxanthin und einen deutlich reduzierten Gehalt an

## 154

Carotinoiden des " $\alpha$ -Carotin-Weges", wie beispielsweise Lutein auf.

Tabelle 2

5

10

Pflanze	Lutein	b-Carotin	Zeaxanthin	Violaxanthin	Gesamt-Carotinoide
Kontrolle	260	4,8	2,7	36	304
CS 30-1	35 (-86%)	13 (+170%)	4,4 (+62%)	59 (+63%)	111 (-63%)
Kontrolle	456	6,4	6,9	58	527
CS 30-3	62 (-86%)	13 (+103%)	8,9 (+29%)	75 (+29%)	159 (-70%)
CS 30-4	68 (-85%)	9,1 (+42%)	5,7 (-17%)	61 (+5%)	144 (-73%)

## 15 Beispiel 17:

Charakterisierung transgener Tagetespflanzen, die Astaxanthin in Blütenblättern akkumulieren

20 Das Blütenmaterial der transgenen *Tagetes erecta* Pflanzen (aus Beispiel 7 mit Plasmid pS5AP3PKETO2) wird in flüssigem Stickstoff gemörst und das Pulver (etwa 30-100 mg) mit 100% Aceton extrahiert (dreimal je 500  $\mu$ l). Das Lösungsmittel wird evaporiert, die Carotinoide in 30  $\mu$ l Petrolether:Aceton (Verhältnis 5:1) resuspendiert und auf einer Silica-Dünnschichtplatte aufgetrennt.

25 Tagetespflanzen mit zusätzlichen roten Carotinoidbanden, die in Kontrollpflanzen nicht auftreten, wurden für präparativ-analytische Analysen ausgewählt. Für analytische Details siehe Beispiel 9.

30 Mittels einer C30-Reverse phase-Säule konnten die individuellen Carotinoide quantifiziert werden. Für analytische Details siehe Beispiel 9.

35 Tabelle 3 zeigt das Carotinoidprofil in Tagetespetalen der gemäß der vorstehend beschriebenen Beispiele hergestellten transgenen Tagetes- und Kontrolltagetespflanzen. Carotinoidkonzentrationen sind prozentual auf den Gehalt an Gesamtcarotinoiden bezogen.

40 Im Vergleich zur genetisch nicht veränderten Kontrollpflanzen weisen die genetisch veränderten Pflanzen, die eine Ketolase exprimieren, einen Gehalt an Astaxanthin auf.

Tabelle 3: Prozentuale Carotinoidkonzentrationen in Astaxanthin synthetisierenden Tagetes und Kontrollpflanzen

5	Tagetes plant	Ant-hera-xanthin	Lutein	Zea-xanthin	Crypto-xanthin	Beta/zeta-carotene	Asta-xanthin	Adoni-rubin	3'-Hydroxy-echine-none	3-Hydroxy-echine-none
	control	1,5	93,6	1,2	0,3	3,8				
	cs19-3	1,3	94,2	1,1	0,3	3,5	0,1		0,05	0,01
10	CHRC::Ketolase	1,3-1,5	93,5-94,4	0,9-1,7	0,01-0,02	2-3,1	0,3-0,9	0,03-0,2	0,2	0-0,01
	DFR-A::Ketolase	4,5	91,8	1,1		2,4	0,2	0,02	0,07	

## 15 Beispiel 18:

Charakterisierung transgener Tagetespflanzen, die eine verringerte Luteinkonzentration aufweisen und Astaxanthin in Blütenblättern akkumulieren

20 Tagetespflanzen, die durch Verwendung des AP3P-Promoters und der Ketolase aus *Haematococcus* in Blütenblättern Astaxanthin synthetisieren (siehe experimentelle Einzelheiten zu pS5AP3PKETO2 in Beispiel 5A) und Tagetespflanzen, die durch Verwendung des RNAi-Konstruktes pS5AI3 (siehe Beispiel 11, Abbildung 13) mittels

25 AP3P-Promoter geringere Mengen an Lutein akkumulieren, wurden gekreuzt. Samen wurden gekeimt und die Nachkommenschaft molekularbiologisch und biochemisch analysiert.

Die Anwesenheit der entsprechenden Expressionskassetten wird  
30 durch genomische PCR untersucht. Dazu wird junges Blattmaterial geerntet und zur Isolierung genomischer DNA verwendet.

Die Integrität der DNA Präparation wird durch Amplifikation eines endogenes Genabschnittes aus der Tagetes Ecyclase, welches  
35 in keinem der Expressionskassetten enthalten ist, mittels Forwardprimer PR29 (PR29: 5'-cccattctcataggtcgtgc-3') und Reverseprimer PR78 (PR78: 5'-gcaagcctgcatggaattgtg-3') kontrolliert. Diese PCR-Reaktion resultiert bei intakter genomischer DNA in einem 0.6 kb-Fragment.

40

Die Ketolase-Expressionskassette lässt sich durch genomische PCR mittels Forwardprimer PR7 (PR7: 5'-gagtcactcactgatttcattgcttg-3') und Reverseprimer PR185 (PR185: 5'-cattaagctgctgtttctca-3') nachweisen. Diese PCR-Reaktion führt bei Anwesen-  
45 heit, nicht bei Abwesenheit, der Ketolase-Expressionskassette zur Produktion eines 0,4 kb-Fragmentes.

## 156

Die Ecyclase-Runterregulierungskassette laesst sich durch genomische PCR mittels Forwardprimer PR7 und Reverseprimer PR41 (PR41: 5'-ggatccggtgatacctgcacatcaac-3') nachweisen. Diese PCR-Reaktion fuehrt bei Anwesenheit, nicht bei Abwesenheit, der Ecyclase-Runterregulierungskassette zur Produktion eines 1,4 kb-Fragmentes.

Die Bedingungen der PCR-Reaktionen sind die folgenden:

10 Die PCR zur Amplifikation der beschriebenen Fragmente erfolgt jeweils in einem 50 ul? Reaktionsansatz, in dem enthalten ist:

- 1 ul? cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 15 - 0.2 uM jeweiliger Forwardprimer
- 0.2 uM jeweiliger Forwardprimer
- 5 ul? 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ul? R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ul? Aq. Dest.

20

Die PCR-Reaktionen werden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt und anschliessend Agarosegelelektrophorese analysiert.

25	1X	94°C	2 Minuten
	35X	94°C	1 Minute
		58°C	1 Minuten
		72°C	1 Minuten
	1X	72°C	10 Minuten

30

Für das biochemische Screening wird das Blütenmaterial der Tagetes erecta Pflanzen in flüssigem Stickstoff gemörsert und das Pulver (etwa 30 bis 100 mg) mit 100% Aceton extrahiert (dreimal je 500 ul). Das Lösungsmittel wird evaporiert, die Carotinoide in

35 30 µl Petrolether:Aceton (Verhältnis 5:1) resuspendiert und auf einer Silica-Dünnschichtplatte aufgetrennt. Tagetespflanzen mit roten Carotinoidbanden, die auf Astaxanthinsynthese schließen lassen, und gleichzeitig weniger intensiven Banden für Luteinester (eine der mobilsten Banden in der Nähe der Laufmittelfront) wurden für präparativ-analytische Analysen ausgewählt. Mittels Esterhydrolyse durch Lipasebehandlung und Auftrennung des Carotinoidgemisches mittels HPLC konnten die individuellen Carotinoide quantifiziert werden. Für analytische Details siehe Beispiel 9.

## 157

Tabelle 4 zeigt das Carotinoidprofil in Tagetespetalen der gemäß der vorstehend beschriebenen Beispiele durch Kreuzung hergestellten transgenen Tagetespflanzen. Carotinoidkonzentrationen sind prozentual auf den Gehalt an Gesamtcarotinoiden bezogen.

5

Im Vergleich zur genetisch nicht veränderten Kontrollpflanzen weisen die genetisch veränderten Pflanzen mit reduzierter epsilon-Cyclase-Aktivität und gleichzeitiger Synthese von Astaxanthin i) einen deutlich erhöhten Gehalt an Carotinoiden des „ $\beta$ -Carotin-Weges“, wie beispielsweise  $\beta$ -Carotin und Zeaxanthin, ii) einen deutlich reduzierten Gehalt an Carotinoiden des „ $\alpha$ -Carotin-Weges“, wie beispielsweise Lutein auf, und iii) Akkumulation von Astaxanthin.

10 des „ $\beta$ -Carotin-Weges“, wie beispielsweise  $\beta$ -Carotin und Zeaxanthin, ii) einen deutlich reduzierten Gehalt an Carotinoiden des „ $\alpha$ -Carotin-Weges“, wie beispielsweise Lutein auf, und iii) Akkumulation von Astaxanthin.

15 Tabelle 4: Prozentuale Carotinoidkonzentrationen in transgenen Tagetes- und Kontrollpflanzen

20 Tagetes plant	Viola-xanthin	Anthera-xanthin	Lutein	Zea-xanthin	Crypto-xanthin	Beta/zeta-carotene	Asta-xanthin	3'-Hydroxy-echinenone	3-Hydroxy-echinenone
control		1,5	93,6	1,2	0,3	3,8			
T109-26	0,6	2,1	65,9	10,4	0,1	19,9	0,3	0,7	0,08
T105-8		3	67,3	8,2	0,1	20,7	0,05	0,4	
T112-5		2,1	48,4	43,6	0,08	5,3	0,05	0,5	

25

Beispiel 19:

Amplifikation einer DNA, die die gesamte Primärsequenz der NP196-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 kodiert

30 Die DNA, die für die NP196-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 kodiert, wurde mittels PCR aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 (Stamm der "American Type Culture Collection") amplifiziert.

35 Für die Präparation von genomischer DNA aus einer Suspensionskultur von *Nostoc punctiforme* ATCC 29133, die 1 Woche mit Dauerlicht und konstantem Schütteln (150 rpm) at 25°C in BG 11-Medium (1,5 g/l NaNO<sub>3</sub>, 0,04 g/l K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, 0,075 g/l MgSO<sub>4</sub>·xH<sub>2</sub>O, 0,036 g/l CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0,006 g/l citric acid, 0,006 g/l Ferric ammonium

40 citrate, 0,001 g/l EDTA disodium magnesium, 0,04 g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1 ml Trace Metal Mix "A5+Co" (2,86 g/l H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1,81 g/l MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0,222 g/l ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,39 g/l NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0,079 g/l CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0,0494 g/l Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O) gewachsen war, wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und

45 im Mörser pulverisiert.

Protokoll für die DNA-Isolation aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133:

Aus einer 10 ml Flüssigkultur wurden die Bakterienzellen durch  
5 10minütige Zentrifugation bei 8000 rpm pelletiert. Anschließend  
wurden die Bakterienzellen in flüssigem Stickstoff mit einem  
Mörser zerstoßen und gemahlen. Das Zellmaterial wurde in 1 ml  
10mM Tris\_HCl (pH 7.5) resuspendiert und in ein Eppendorf-Reak-  
tionsgefäß (2ml Volumen) überführt. Nach Zugabe von 100 µl Pro-  
10 teinase K (Konzentration: 20 mg/ml) wurde die Zellsuspension für  
3 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension  
mit 500 µl Phenol extrahiert. Nach 5minütiger Zentrifugation bei  
13000 upm wurde die obere, wässrige Phase in ein neues 2-ml-  
Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion mit Phenol  
15 wurde 3mal wiederholt. Die DNA wurde durch Zugabe von 1/10 Volu-  
men 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 0,6 Volumen Isopropanol ge-  
fällt und anschließend mit 70 % Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet  
wurde bei Raumtemperatur getrocknet, in 25 µl Wasser aufgenommen  
und unter Erhitzung auf 65°C gelöst.

20

Die Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase aus *Nostoc punctiforme*  
ATCC 29133, wurde mittels "polymerase chain reaction" (PCR) aus  
*Nostoc punctiforme* ATCC 29133 unter Verwendung eines sense-spezi-  
fischen Primers (NP196-1, SEQ ID No. 129) und eines antisense-  
25 spezifischen Primers (NP196-2 SEQ ID No. 130) amplifiziert.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die für ein Ketolase Protein  
30 bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert, erfolgte in  
einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl einer *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 DNA (hergestellt wie  
oben beschrieben)
- 35 - 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM NP196-1 (SEQ ID No. 129)
- 0.2 mM NP196-2 (SEQ ID No. 130)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 40 - 25.8 µl Aq. Dest.



## 159

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
5	55°C	1 Minuten
	72°C	3 Minuten
1X	72°C	10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 129 und SEQ ID No. 130 resultierte in einem 792 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert (NP196, SEQ ID No. 131). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und der Klon pNP196 erhalten.

15 Sequenzierung des Klons pNP196 mit dem M13F- und dem M13R-Primer bestätigte eine Sequenz, welche mit der DNA-Sequenz von 140.571-139.810 des Datenbank-eintrages NZ\_AABC01000196 identisch ist (inverse orientiert zum veröffentlichten Datenbankeintrag) mit 20 der Ausnahme, daß G in Position 140.571 durch A ersetzt wurde, um ein Standard-Startkodon ATG zu erzeugen. Diese Nukleotidsequenz wurde in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz im verwendeten *Nostoc punctiforme* ATCC 29133.

25 Dieser Klon pNP196 wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

30 pJIT117 wurde modifiziert, indem der 35S-Terminator durch den OCS-Terminator (Octopine Synthase) des Ti-Plasmides pTi15955 von *Agrobacterium tumefaciens* (Datenbankeintrag X00493 von Position 12,541-12,350, Gielen et al. (1984) EMBO J. 3 835-846) ersetzt wurde.

35 Das DNA-Fragment, das die OCS-Terminatorregion beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung des Plasmides pHELLSGATE (Datenbankeintrag AJ311874, Wesley et al. (2001) Plant J. 27 581-590, nach Standardmethoden aus *E.coli* isoliert) sowie der Primer OCS-1 40 (SEQ ID No. 133) und OCS-2 (SEQ ID No. 134) hergestellt.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die die Octopin Synthase (OCS) 45 Terminatorregion (SEQ ID No. 135) beinhaltet, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten waren:

160

- 100 ng pHELLSGATE plasmid DNA
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM OCS-1 (SEQ ID No. 133)
- 0.2 mM OCS-2 (SEQ ID No. 134)
- 5 - 5 ul? 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 ul? Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28.8 ul? Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 10
- |       |      |            |
|-------|------|------------|
| 1X    | 94°C | 2 Minuten  |
| 35X   | 94°C | 1 Minute   |
|       | 50°C | 1 Minute   |
|       | 72°C | 1 Minute   |
| 15 1X | 72°C | 10 Minuten |

Das 210 bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pOCS erhalten.

- 20
- Sequenzierung des Klons pOCS bestätigte eine Sequenz, die mit einem Sequenzabschnitt auf dem Ti-Plasmid pTi15955 von *Agrobacterium tumefaciens* (Datenbankeintrag X00493) von Position 12.541 bis 12.350 übereinstimmt.

- 25
- Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 210 bp SalI-XhoI Fragmentes aus pOCS und Ligierung in den SalI-XhoI geschnittenen Vektor pJIT117.

- 30
- Dieser Klon heisst pJO und wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJONP196 verwendet.

- Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 782 Bp SphI-Fragmentes aus pNP196 und Ligierung in den SphI geschnittenen Vektor
- 35 pJO. Der Klon, der die NP196-Ketolase von *Nostoc punctiforme* in der korrekten Orientierung als N-terminale translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJONP196.

Beispiel 20:

- 40
- Herstellung von Expressionsvektoren zur konstitutiven Expression der NP196-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 in *Lycopersicon esculentum* und *Tagetes erecta*.

- Die Expression der NP196-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* in
- 45 *L. esculentum* und in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle des konstitutiven Promoters FNR (Ferredoxin-NADPH- Oxidoreductase, Datenbankeintrag AB011474 Position 70127 bis 69493; W003/006660),

## 161

aus *Arabidopsis thaliana*. Das FNR-Gen beginnt bei Basenpaar 69492 und ist mit "Ferredoxin-NADP+ Reductase" annotiert. Die Expression erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715).

5

Das DNA Fragment, das die FNR Promotorregion aus *Arabidopsis thaliana* beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethoden aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) sowie der Primer FNR-1 (SEQ ID No. 136) und FNR-2 (SEQ ID No. 137)

10 hergestellt.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das FNR-Promotorfragment FNR (SEQ ID No. 138) beinhaltet, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

15

- 100 ng genomischer DNA aus *A.thaliana*
- 0.25 mM dNTPs
- 20 - 0.2 mM FNR-1 (SEQ ID No. 136)
- 0.2 mM FNR-2 (SEQ ID No. 137)
- 5 µl? 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl? Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl? Aq. Dest.

25

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

30

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
	50°C	1 Minute
	72°C	1 Minute
1X	72°C	10 Minuten

Das 652 bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pFNR erhalten.

35

Sequenzierung des Klons pFNR bestätigte eine Sequenz, die mit einem Sequenzabschnitt auf Chromosom 5 von *Arabidopsis thaliana* (Datenbankeintrag AB011474) von Position 70127 bis 69493 übereinstimmt.

40

Dieser Klon heisst pFNR und wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJONP196 (in Beispiel 19 beschrieben)

45 verwendet.

## 162

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 644 bp SmaI-HindIII Fragmentes aus pFNR und Ligierung in den Ecl136II-HindIII geschnittenen Vektor pJONP196. Der Klon, der den Promoter FNR anstelle des ursprünglichen Promoters d35S und das Fragment NP196 in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJOFNR:NP196.

Die Herstellung einer Expressionskassette für die Agrobacterium vermittelte Transformation der NP196-Ketolase aus *Nostoc* in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3 (WO02/00900).

Zur Herstellung des Expressionsvektors MSP105 wurde das 1.839 bp EcoRI-XhoI Fragment aus pJOFNR:NP196 mit dem EcoRI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert (Abbildung 22, Konstruktkarte). In der Abbildung 22 beinhaltet Fragment FNR Promotor den FNR Promotor (635 bp), Fragment rbcS TP FRAGMENT das rbcS Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment NP196 KETO CDS (761 bp), kodierend für die *Nostoc punctiforme* NP196-Ketolase, Fragment OCS Terminator (192 bp) das Polyadenylierungssignal von der Octopin- Synthase.

Die Herstellung einer Expressionskassette für die Agrobacterium- vermittelte Transformation des Expressionsvektor mit der NP196-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

Zur Herstellung des *Tagetes*-Expressionsvektors MSP106 wurde das 1.839 bp EcoRI-XhoI Fragment aus pJOFNR:NP196 mit dem EcoRI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 23, Konstruktkarte). In der Abbildung 23 beinhaltet Fragment FNR Promotor den FNR Promotor (635 bp), Fragment rbcS TP FRAGMENT das rbcS Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment NP196 KETO CDS (761 bp), kodierend für die *Nostoc punctiforme* NP196-Ketolase, Fragment OCS Terminator (192 bp) das Polyadenylierungssignal von Octopin- Synthase.

Beispiel 21:

Herstellung von Expressionsvektoren zur blütenspezifischen Expression der NP196-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 in *Lycopersicon esculentum* und *Tagetes erecta*

Die Expression der NP196-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* in *L. esculentum* und *Tagetes erecta* erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715). Die Expression erfolgte unter Kontrolle des blütenspezifischen Promoters EPSPS aus *Petunia hybrida* (Datenbankeintrag M37029:

Nukleotidregion 7-1787; Benfey et al. (1990) Plant Cell 2: 849-856).

Das DNA Fragment, das die EPSPS Promoterregion (SEQ ID No. 141) aus *Petunia hybrida* beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethoden aus *Petunia hybrida* isoliert) sowie der Primer EPSPS-1 (SEQ ID No. 139) und EPSPS-2 (SEQ ID No. 140) hergestellt.

10 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das EPSPS-Promoterfragment (Datenbankeintrag M37029: Nukleotidregion 7-1787) beinhaltet, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 15 - 100 ng genomischer DNA aus *A.thaliana*
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM EPSPS-1 (SEQ ID No. 139)
- 0.2 mM EPSPS-2 (SEQ ID No. 140)
- 20 - 5 µl? 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl? Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl? Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 25 1X 94°C 2 Minuten
- 35X 94°C 1 Minute
- 50°C 1 Minute
- 72°C 2 Minuten
- 30 1X 72°C 10 Minuten

Das 1773 Bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pEPSPS erhalten.

35

Sequenzierung des Klons pEPSPS bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich durch zwei Deletion (Basen ctaagtttcagga in Position 46-58 der Sequenz M37029; Basen aaaaatat in Position 1422-1429 der Sequenz M37029) und die Basenaustausche (T statt G in Position 1447 der Sequenz M37029; A statt C in Position 1525 der Sequenz M37029; A statt G in Position 1627 der Sequenz M37029) von der publizierten EPSPS-Sequenz (Datenbankeintrag M37029: Nukleotidregion 7-1787) unterscheidet. Die zwei Deletionen und die zwei Basenaustausche an den Positionen 1447 und 1627 der Sequenz M37029 wurden in einem unabhängigen Amplifikations-

## 164

experiment reproduziert und repräsentieren somit die tatsächliche Nukleotidsequenz in den verwendeten *Petunia hybrida* Pflanzen.

Der Klon pEPSPS wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJONP196 (in Beispiel 19 beschrieben) verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1763 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus pEPSPS und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJONP196. Der Klon, der den Promoter EPSPS anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJOESP:NP196. Diese Expressionskassette enthält das Fragment NP196 in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS-Transitpeptid.

- 15 Die Herstellung eines Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der EPSPS-kontrollierten NP196-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3 (WO02/00900).
- 20 Zur Herstellung des Expressionsvektors MSP107 wurde das 2.961 KB bp SacI-XhoI Fragment aus pJOESP:NP196 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert (Abbildung 24, Konstruktkarte). In der Abbildung 24 beinhaltet Fragment EPSPS den EPSPS Promoter (1761 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das rbcS Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *NP196 KETO CDS* (761 bp), kodierend für die *Nostoc punctiforme* NP196-Ketolase, Fragment *OCS Terminator* (192 bp) das Polyadenylierungssignal von Octopin-Synthase.

- Die Herstellung einer Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der EPSPS-kontrollierten NP196-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

- Zur Herstellung des Expressionsvektors MSP108 wurde das 2.961 KB bp SacI-XhoI Fragment aus pJOESP:NP196 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 25, Konstruktkarte). In der Abbildung 25 beinhaltet Fragment EPSPS den EPSPS Promoter (1761 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das rbcS Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *NP196 KETO CDS* (761 bp), kodierend für die *Nostoc punctiforme* NP196-Ketolase, Fragment *OCS Terminator* (192 bp) das Polyadenylierungssignal von Octopin-Synthase.

## Beispiel 22:

Amplifikation einer DNA, die die gesamte Primärsequenz der NP195-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 kodiert

- 5 Die DNA, die für die NP195-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 kodiert, wurde mittels PCR aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 (Stamm der "American Type Culture Collection") amplifiziert. Die Präparation von genomischer DNA aus einer Suspensionskultur von *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 wurde in Beispiel 10 19 beschrieben.

- 15 Die Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133, wurde mittels "polymerase chain reaction" (PCR) aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 unter Verwendung eines sense-spezifischen Primers (NP195-1, SEQ ID No. 142) und eines antisense-spezifischen Primers (NP195-2 SEQ ID No. 143) amplifiziert.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

- 20 Die PCR zur Amplifikation der DNA, die für ein Ketolase Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert, erfolgte in einem 50 ul Reaktionsansatz, in dem enthalten war:
- 1 ul einer *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 DNA (hergestellt wie
  - 25 oben beschrieben)
  - 0.25 mM dNTPs
  - 0.2 mM NP195-1 (SEQ ID No. 142)
  - 0.2 mM NP195-2 (SEQ ID No. 143)
  - 5 ul 10X PCR-Puffer (TAKARA)
  - 30 - 0.25 ul R Taq Polymerase (TAKARA)
  - 25.8 ul Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- |    |     |      |            |
|----|-----|------|------------|
| 35 | 1X  | 94°C | 2 Minuten  |
|    | 35X | 94°C | 1 Minute   |
|    |     | 55°C | 1 Minuten  |
|    |     | 72°C | 3 Minuten  |
|    | 1X  | 72°C | 10 Minuten |

40

- Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 142 und SEQ ID No. 143 resultierte in einem 819 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert (NP195, SEQ ID No. 144). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den
- 45 PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und der Klon pNP195 erhalten.

## 166

Sequenzierung des Klons pNP195 mit dem M13F- und dem M13R-Primer bestätigte eine Sequenz, welche mit der DNA-Sequenz von 55,604-56,392 des Datenbank-eintrages NZ\_AABC010001965 identisch ist, mit der Ausnahme, daß T in Position 55.604 durch A ersetzt wurde, um ein Standard-Startkodon ATG zu erzeugen. Diese Nukleotidsequenz wurde in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz im verwendeten *Nostoc punctiforme* ATCC 29133.

- 10 Dieser Klon pNP195 wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJ0 (in Beispiel 19 beschrieben) verwendet. Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 809 Bp SphI-Fragmentes aus pNP195 und Ligierung in den SphI geschnittenen Vektor pJ0. Der Klon, der die NP195-Ketolase von *Nostoc punctiforme* in der
- 15 korrekten Orientierung als N-terminale translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJONP195.

## Beispiel 23:

- Herstellung von Expressionsvektoren zur konstitutiven Expression
- 20 der NP195-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 in *Lycopersicon esculentum* und *Tagetes erecta*.

- Die Expression der NP195-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* in *L. esculentum* und in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle des
- 25 konstitutiven Promoters FNR (Ferredoxin-NADPH-Oxidoreductase, Datenbankeintrag AB011474 Position 70127 bis 69493; W003/006660), aus *Arabidopsis thaliana*. Das FNR-Gen beginnt bei Basenpaar 69492 und ist mit "Ferredoxin-NADP+ Reductase" annotiert. Die Expression erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson
- 30 et al. 1986, Biochem J. 240:709-715).

Der Klon pFNR (in Beispiel 20 beschrieben) wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJONP195 (in Beispiel 22 beschrieben) verwendet.

35

- Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 644 bp Sma-HindIII Fragmentes aus pFNR und Ligierung in den Ecl136II-HindIII geschnittenen Vektor pJONP195. Der Klon, der den Promoter FNR anstelle des ursprünglichen Promoters d35S und das Fragment
- 40 NP195 in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJOFNR:NP195.

- Die Herstellung einer Expressionskassette für die Agrobacterium vermittelte Transformation der NP195-Ketolase aus *Nostoc puncti-*
- 45 *forme* in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3 (W002/00900).



## 167

- Zur Herstellung des Expressionsvektors MSP109 wurde das 1.866 bp EcoRI-XhoI Fragment aus pJOFNR:NP195 mit dem EcoRI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert (Abbildung 26, Konstruktkarte). In der Abbildung 26 beinhaltet Fragment *FNR Promotor* den FNR Promotor
- 5 (635 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das rbcS Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *NP195 KETO CDS* (789 bp), kodierend für die *Nostoc punctiforme* NP195-Ketolase, Fragment *OCS Terminator* (192 bp) das Polyadenylierungssignal von der Octopin- Synthase.
- 10 Die Herstellung einer Expressionskassette für die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation des Expressionsvektor mit der NP195-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* *punctiforme* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO 02/00900).
- 15 Zur Herstellung des *Tagetes*-Expressionsvektors MSP110 wurde das 1.866 bp EcoRI-XhoI Fragment aus pJOFNR:NP195 mit dem EcoRI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 27, Konstruktkarte). In der Abbildung 27 beinhaltet Fragment *FNR Promotor* den
- 20 FNR Promotor (635 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das rbcS Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *NP195 KETO CDS* (789 bp), kodierend für die *Nostoc punctiforme* NP195-Ketolase, Fragment *OCS Terminator* (192 bp) das Polyadenylierungssignal von Octopin-Synthase.
- 25 Beispiel 24:  
Herstellung von Expressionsvektoren zur blütenspezifischen Expression der NP195-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 in *Lycopersicon esculentum* und *Tagetes erecta*.
- 30 Die Expression der NP195-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* in *L. esculentum* und *Tagetes erecta* erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715). Die Expression erfolgte unter Kontrolle des blütenspezifischen
- 35 Promoters EPSPS aus *Petunia hybrida* (Datenbankeintrag M37029: Nukleotidregion 7-1787; Benfey et al. (1990) Plant Cell 2: 849-856).
- Der Klon pEPSPS (in Beispiel 21 beschrieben) wurde daher für die
- 40 Klonierung in den Expressionsvektor pJONP195 (in Beispiel 22 beschrieben) verwendet.
- Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1763 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus pEPSPS und Ligierung in den SacI-HindIII
- 45 geschnittenen Vektor pJONP195. Der Klon, der den Promoter EPSPS anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJOESP:NP195. Diese Expressionskassette enthält das Fragment

NP195 in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem *rbcS*-Transitpeptid.

Die Herstellung eines Expressionsvektors für die Agrobacterium-  
5 vermittelte Transformation der EPSPS-kontrollierten NP195-Ketolase aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3 (WO02/00900).

Zur Herstellung des Expressionsvektors MSP111 wurde das 2.988 KB  
10 bp *SacI*-*XhoI* Fragment aus pJOESP:NP195 mit dem *SacI*-*XhoI* geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert (Abbildung 28, Konstruktkarte). In der Abbildung 28 beinhaltet Fragment EPSPS den EPSPS Promoter (1761 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment NP195 *KETO CDS* (789 bp), kodierend für  
15 die *Nostoc punctiforme* NP195-Ketolase, Fragment *OCS Terminator* (192 bp) das Polyadenylierungssignal von Octopin-Synthase.

Die Herstellung einer Expressionsvektors für die Agrobacterium-  
vermittelte Transformation der EPSPS-kontrollierten NP195-Keto-  
20 lase aus *Nostoc punctiforme* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

Zur Herstellung des Expressionsvektors MSP112 wurde das 2.988 KB  
bp *SacI*-*XhoI* Fragment aus pJOESP:NP195 mit dem *SacI*-*XhoI* geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 29, Konstruktkarte). In der Abbildung 29 beinhaltet Fragment EPSPS den EPSPS Promoter (1761 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment NP195 *KETO CDS* (789 bp), kodierend für  
die *Nostoc punctiforme* NP195-Ketolase, Fragment *OCS Terminator*  
30 (192 bp) das Polyadenylierungssignal von Octopin-Synthase.

#### Beispiel 25:

Amplifikation einer DNA, die die gesamte Primärsequenz der NODK-Ketolase aus *Nodularia spumignea* NSOR10 kodiert.

35

Die DNA, die für die Ketolase aus *Nodularia spumignea* NSOR10 kodiert, wurde mittels PCR aus *Nodularia spumignea* NSOR10 amplifiziert.

40 Für die Präparation von genomischer DNA aus einer Suspensionskultur von *Nodularia spumignea* NSOR10, die 1 Woche mit Dauerlicht und konstantem Schütteln (150 rpm) at 25°C in BG 11-Medium (1,5 g/l NaNO<sub>3</sub>, 0,04 g/l K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, 0,075 g/l MgSO<sub>4</sub>·xH<sub>2</sub>O, 0,036 g/l CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0,006 g/l citric acid, 0,006 g/l Ferric ammonium citrate, 0,001 g/l EDTA disodium magnesium, 0,04 g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1 ml  
45 Trace Metal Mix "A5+Co" (2,86 g/l H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1,81 g/l MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0,222 g/l ZnSO<sub>4</sub>·xH<sub>2</sub>O, 0,39 g/l NaMoO<sub>4</sub>·xH<sub>2</sub>O, 0,079 g/l CuSO<sub>4</sub>·xH<sub>2</sub>O,

0,0494 g/l  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  gewachsen war, wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Mörser pulverisiert.

### 5 Protokoll für die DNA-Isolation aus *Nodularia spumigna* NSOR10:

- Aus einer 10 ml Flüssigkultur wurden die Bakterienzellen durch 10minütige Zentrifugation bei 8000 rpm pelletiert. Anschließend wurden die Bakterienzellen in flüssigem Stickstoff mit einem
- 10 Mörser zerstoßen und gemahlen. Das Zellmaterial wurde in 1 ml 10 mM Tris\_HCl (pH 7,5) resuspendiert und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (2 ml Volumen) überführt. Nach Zugabe von 100 µl Proteinase K (Konzentration: 20 mg/ml) wurde die Zellsuspension für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde
- 15 die Suspension mit 500 µl Phenol extrahiert. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 13 000 upm wurde die obere, wässrige Phase in ein neues 2-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion mit Phenol wurde 3mal wiederholt. Die DNA wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 0,6 Volumen Iso-
- 20 propanol gefällt und anschließend mit 70 % Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet, in 25 µl Wasser aufgenommen und unter Erhitzung auf 65°C gelöst.

- Die Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase aus *Nodularia spumigna* NSOR10, wurde mittels "polymerase chain reaction" (PCR) aus *Nodularia spumigna* NSOR10 unter Verwendung eines sense-spezifischen Primers (NODK-1, SEQ ID No. 146) und eines antisense-spezifischen Primers (NODK-2 SEQ ID No. 147) amplifiziert.

### 30 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die für ein Ketolase Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert, erfolgte in einem 50 ul Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

35

- 1 ul einer *Nodularia spumigna* NSOR10 DNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM NODK-1 (SEQ ID No. 146)
- 40 - 0.2 mM NODK-2 (SEQ ID No. 147)
- 5 ul 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ul R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25.8 ul Aq. Dest.

## 170

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
5	55°C	1 Minuten
	72°C	3 Minuten
1X	72°C	10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 146 und SEQ ID No. 147 resultierte in einem 720 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert (NODK, SEQ ID No. 148). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und der Klon pNODK erhalten.

15 Sequenzierung des Klons pNODK mit dem M13F- und dem M13R-Primer bestätigte eine Sequenz, welche mit der DNA-Sequenz von 2130-2819 des Datenbank-eintrages AY210783 identisch ist (inverse orientiert zum veröffentlichen Datenbankeintrag). Diese Nukleotid-  
20 sequenz wurde in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz im verwendeten *Nodularia spumigena* NSOR10.

Dieser Klon pNODK wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJ0 (in Beispiel 19 beschrieben) verwendet. Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 710 Bp SphI-Fragmentes aus pNODK und Ligierung in den SphI geschnittenen Vektor pJ0. Der Klon, der die NODK-Ketolase von *Nodularia spumigena* in der korrekten Orientierung als N-terminale translationale Fusion mit  
30 dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJONODK.

Beispiel 26:  
Herstellung von Expressionsvektoren zur konstitutiven Expression der NODK-Ketolase aus *Nodularia spumigena* NSOR10 in *Lycopersicon esculentum* und *Tagetes erecta*.  
35

Die Expression der NODK-Ketolase aus *Nodularia spumigena* NSOR10 in *L. esculentum* und in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle des konstitutiven Promoters FNR (Ferredoxin-NADPH- Oxidoreductase, Datenbankeintrag AB011474 Position 70127 bis 69493; WO03/006660), aus *Arabidopsis thaliana*. Das FNR-Gen beginnt bei  
40 Basenpaar 69492 und ist mit "Ferredoxin-NADP+ Reductase" annotiert. Die Expression erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715).

## 171

Der Klon pFNR (in Beispiel 20 beschrieben) wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJONODK (in Beispiel 25 beschrieben) verwendet.

- 5 Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 644 bp Sma-HindIII Fragmentes aus pFNR und Ligierung in den Ecl136II-HindIII geschnittenen Vektor pJONODK. Der Klon, der den Promoter FNR anstelle des ursprünglichen Promoters d35S und das Fragment NODK in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS  
10 Transitpeptid enthält, heisst pJOFNR:NODK.

Die Herstellung einer Expressionskassette für die *Agrobacterium* vermittelte Transformation der NODK-Ketolase aus *Nodularia spumigena* NSOR10 in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung  
15 des binären Vektors pSUN3 (W002/00900).

- Zur Herstellung des Expressionsvektors MSP113 wurde das 1.767 bp EcoRI-XhoI Fragment aus pJOFNR:NODK mit dem EcoRI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert (Abbildung 30, Konstruktkarte). In der  
20 Abbildung 30 beinhaltet Fragment FNR Promotor den FNR Promotor (635 bp), Fragment rbcS TP FRAGMENT das rbcS Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment NODK KETO CDS (690 bp), kodierend für die *Nodularia spumigena* NSOR10 NODK-Ketolase, Fragment OCS Terminator (192 bp) das Polyadenylierungssignal von der Octopin-  
25 Synthase.

- Die Herstellung einer Expressionskassette für die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation des Expressionsvektor mit der NODK-Ketolase aus *Nodularia spumigena* NSOR10 punctiforme in *Tagetes*  
30 erecta erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (W002/00900).

- Zur Herstellung des *Tagetes*-Expressionsvektors MSP114 wurde das 1.767 bp EcoRI-XhoI Fragment aus pJOFNR:NODK mit dem EcoRI-XhoI  
35 geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 31, Konstruktkarte). In der Abbildung 31 beinhaltet Fragment FNR Promotor den FNR Promotor (635 bp), Fragment rbcS TP FRAGMENT das rbcS Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment NODK KETO CDS (690 bp), kodierend für die *Nodularia spumigena* NSOR10 NODK-Ketolase, Frag-  
40 ment OCS Terminator (192 bp) das Polyadenylierungssignal von Octopin-Synthase.

Beispiel 27:

Herstellung von Expressionsvektoren zur blütenspezifischen Expression der NODK-Ketolase aus *Nodularia spumigena* NSOR10 in *Lycopersicon esculentum* und *Tagetes erecta*.

- 5 Die Expression der NODK-Ketolase aus *Nodularia spumigena* NSOR10 in *L. esculentum* und *Tagetes erecta* erfolgte mit dem Transitpeptid *rbcS* aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715). Die Expression erfolgte unter Kontrolle des blüten-
- 10 spezifischen Promoters EPSPS aus *Petunia hybrida* (Datenbankeintrag M37029: Nukleotidregion 7-1787; Benfey et al. (1990) Plant Cell 2: 849-856).

- Der Klon pEPSPS (in Beispiel 21 beschrieben) wurde daher für
- 15 die Klonierung in den Expressionsvektor pJONODK (in Beispiel 25 beschrieben) verwendet.

- Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1763 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus pEPSPS und Ligierung in den SacI-HindIII geschnit-
- 20 tenen Vektor pJONODK. Der Klon, der den Promoter EPSPS anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJOESP:NODK. Diese Expressionskassette enthält das Fragment NODK in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem *rbcS*-Transitpeptid.

- 25 Die Herstellung eines Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der EPSPS-kontrollierten NODK-Ketolase aus *Nodularia spumigena* NSOR10 in *L. esculentum* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN3 (WO02/00900).

- 30 Zur Herstellung des Expressionsvektors MSP115 wurde das 2.889 KB bp SacI-XhoI Fragment aus pJOESP:NODK mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN3 ligiert (Abbildung 32, Konstruktkarte). In der Abbildung 32 beinhaltet Fragment EPSPS den EPSPS Promoter (1761
- 35 bp), Fragment *rbcS* TP FRAGMENT das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment NODK KETO CDS (690 bp), kodierend für die *Nodularia spumigena* NSOR10 NODK-Ketolase, Fragment OCS Terminator (192 bp) das Polyadenylierungssignal von Octopin-Synthase.

- 40 Die Herstellung einer Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der EPSPS-kontrollierten NODK-Ketolase aus *Nodularia spumigena* NSOR10 in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

- 45 Zur Herstellung des Expressionsvektors MSP116 wurde das 2.889 KB bp SacI-XhoI Fragment aus pJOESP:NODK mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 33, Konstruktkarte). In

173

der Abbildung 33 beinhaltet Fragment EPSPS den EPSPS Promoter (1761 bp), Fragment *rbcS TP FRAGMENT* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (194 bp), Fragment *NODK KETO CDS* (690 bp), kodierend für die *Nodularia spumignea NSOR10* NODK-Ketolase, Fragment *OCS Terminator* (192 bp) das Polyadenylierungssignal von Octopin-Synthase.

Beispiel 28:

Herstellung transgener *Lycopersicon esculentum* Pflanzen

- 10 Transformation und Regeneration von Tomatenpflanzen wurde wie in Beispiel 6 beschrieben durchgeführt.

Gemäß der in Beispiel 6 beschriebenen Transformationsmethode wurden mit folgenden Expressionskonstrukten folgende Linien

15 erhalten:

Mit MSP105 wurde erhalten: msp105-1, msp105-2, msp105-3

Mit MSP107 wurde erhalten: msp107-1, msp107-2, msp107-3

- 20 Mit MSP109 wurde erhalten: msp109-1, msp109-2, msp109-3

Mit MSP111 wurde erhalten: msp111-1, msp111-2, msp111-3

Mit MSP113 wurde erhalten: msp113-1, msp113-2, msp113-3

Mit MSP115 wurde erhalten: msp115-1, msp115-2, msp115-3

25

Die Charakterisierung und Analyse der transgenen *Lycopersicon esculentum* Pflanzen erfolgt wie in Beispiel 6 beschrieben.

Beispiel 29:

- 30 Herstellung transgener *Tagetes* Pflanzen

Die Transformation und Regeneration von *Tagetes* Pflanzen wurde wie in Beispiel 7 beschrieben durchgeführt.

- 35 Gemäß der in Beispiel 7 beschriebenen Transformationsmethode wurden mit folgenden Expressionskonstrukten folgende Linien erhalten:

Mit MSP106 wurde erhalten: msp106-1, msp106-2, msp106-3

40

Mit MSP108 wurde erhalten: msp108-1, msp108-2, msp108-3

Mit MSP110 wurde erhalten: msp110-1, msp110-2, msp110-3

Mit MSP112 wurde erhalten: msp112-1, msp112-2, msp112-3

- 45 Mit MSP114 wurde erhalten: msp114-1, msp114-2, msp114-3

Mit MSP116 wurde erhalten: msp116-1, msp116-2, msp116-3

Die Charakterisierung der transgenen *Tagetes* Pflanzen erfolgt wie unter Beispiel 8 und 9 sowie wie in Beispiel 17 beschrieben.

Beispiel 30:

- 5 Herstellung eines Doppel-Expressionsvektors zur Runterregulierung der Epsilon-Cyclase Transkriptmengen sowie der Expression der *Nostoc punctiforme* Ketolase NP196-1 blütenspezifisch in *Tagetes erecta*.
- 10 Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 2963 Bp Ecl136II-XhoI Fragmentes aus MSP107 (siehe Beispiel 21) und Ligierung mit dem XhoI-SmaI geschnittenen Vektor pS5AI7 (Beispiel 14). Durch die Ligation entsteht eine T-DNA die zwei Expressionskassetten enthaelt: erstens die Inverted-Repeat-Cassette gerichtet gegen
- 15 die Ecyclase aus *Tagetes erecta* und zweitens eine Kassette zur Überexpression der Ketolase NP196-1 aus *Nostoc punctiforme*. Dieser Klon, heisst pCSP01 (Abbildung 34, Konstruktkarte). In der Abbildung 34 beinhaltet Fragment AP3P (776 bp) den AP3P-Promoter, Fragment *ecycS* (439 bp) die 5'Region der *Tagetes Ecyclase* Sequenz
- 20 aus pJIT117, Fragment *intron* ( 207 bp) das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment *ecycAS* (440 bp) die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* in Antisense-Orientierung, Fragment 35T (763 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV. Weiterhin beinhaltet Fragment *ocs* (191 bp) das Polyadenylierungs-
- 25 signal des Octopin-Synthasegens, Fragment NP196 (762 bp) die Ketolase aus *Nostoc punctiforme*, Fragment TP (183 bp) das Trans- itpeptid des *rbcS* Gens aus Erbse, Fragment EPSPS (1761 bp) den EPSPS Promoter.
- 30 Beispiel 31:  
Herstellung einer Expressionskassette zur blütenspezifischen Überexpression der chromoplastenspezifischen B-Hydroxylase aus *Lycopersicon esculentum*.

- 35 Die Expression der chromoplastenspezifischen B-Hydroxylase aus *Lycopersicon esculentum* in *Tagetes erecta* erfolgt unter Kontrolle des blütenspezifischen Promoters EPSPS aus Petunie (Beispiel 21). Als Terminatorelement wird LB3 aus *Vicia faba* verwendet. Die Sequenz der chromoplastenspezifischen B-Hydroxylase wurde durch
- 40 RNA Isolierung, reverse Transkription und PCR hergestellt.

Für die Herstellung der LB3-Terminator-Sequenz aus *Vicia faba* wird genomische DNA aus *Vicia faba*-Gewebe nach Standardmethoden isoliert und durch genomische PCR unter Verwendung der Primer

- 45 PR206 und PR207 eingesetzt. Die PCR zur Amplifikation dieses LB3



## 175

DNA-Fragmentes, erfolgt in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten ist:

- 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 5 - 0.25 mM dNTPs
- 0.2 µM PR206 (SEQ ID No. 150)
- 0.2 µM PR207 (SEQ ID No. 151)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 10 - 28.8 µl Aq. Dest.

Die PCR-Amplifikation mit PR206 und PR207 resultiert in einem 0.3 kb Fragment das für den LB-Terminator enthaelt. Das Amplifikat wird in den Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert.

- 15 Sequenzierungen mit den Primern T7 und M13 bestätigen eine zur Sequenz SEQ ID: 160 identische Sequenz. Dieser Klon heisst pTA-LB3 und wird daher für die Klonierung in den Vektor pJIT117 verwendet (siehe unten).

- 20 Für die Herstellung der b-Hydroxylase-Sequenz wird Total-RNA aus Tomate präpariert. Dazu werden 100 mg der gefrorenen, pulverisierten Blüten in ein Reaktionsgefäß überführt und in 0,8 ml Trizol-Puffer (LifeTechnologies) aufgenommen. Die Suspension wird mit 0,2 ml Chloroform extrahiert. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 12000 g wird der wässrige Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Ethanol extrahiert. Die RNA wird mit einem Volumen Isopropanol gefällt, mit 75 % Ethanol gewaschen und das Pellet in DEPC Wasser (über Nacht Inkubation von Wasser mit 1/1000 Volumen Diethylpyrocarbonat bei Raumtemperatur, anschließend autoklaviert) gelöst.
- 25 Die RNA-Konzentration wird photometrisch bestimmt. Für die cDNA-Synthese werden 2,5 µg Gesamt-RNA für 10 min bei 60°C denaturiert, für 2 min auf Eis abgekühlt und mittels eines cDNA-Kits (Ready-to-go-you-prime-beads, Pharmacia Biotech) nach Herstellerangaben unter Verwendung eines antisense spezifischen Primers (PR215 SEQ ID No. 152) in cDNA umgeschrieben.
- 30
- 35

Die Bedingungen der anschließenden PCR-Reaktionen sind die folgenden:

40

Die PCR zur Amplifikation des VPR203-PR215 DNA-Fragmentes, das fuer die B-Hydroxylase kodiert, erfolgt in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 45 - 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 µM VPR203 (SEQ ID No. 159)

## 176

- 0.2 uM PR215 (SEQ ID No. 152)
- 5 ul 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ul R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ul Aq. Dest.

5

Die PCR-Amplifikation mit VPR203 und PR215 resultiert in einem 0.9 kb Fragment das für die b-Hydroxylase kodiert. Das Amplifikat wird in den Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern T7 und M13 bestätigen eine zur

- 10 Sequenz SEQ ID No. 161 identische Sequenz. Dieser Klon heisst pTA-CrtR-b2 und wird daher für die Klonierung in den Vektor pCSP02 verwendet(siehe unten).

Die EPSPS-Promoter-Sequenz aus Petunie wird durch PCR Amplifikation unter Verwendung des Plasmides MSP107 (s. Beispiel 21) und der Primer VPR001 und VPR002 hergestellt. Die PCR zur Amplifikation dieses EPSPS-DNA-Fragmentes, erfolgt in einem 50 ul Reaktionsansatz, in dem enthalten ist:

- 20 - 1 ul cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
  - 0.2 uM VPR001 (SEQ ID No. 157)
  - 0.2 uM VPR002 (SEQ ID No. 158)
  - 5 ul 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 25 - 0.25 ul R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ul Aq. Dest.

- Die PCR-Amplifikation mit VPR001 und VPR002 resultiert in einem 1.8 kb Fragment das den EPSPS-Promoter kodiert. Das Amplifikat wird in den Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern T7 und M13 bestätigen eine zur Sequenz SEQ ID: 162 identische Sequenz. Dieser Klon heisst pTA-EPSPS und wird daher für die Klonierung in den Vektor pCSP03 verwendet (siehe unten).

35

Der erste Klonierungsschritt erfolgt durch Isolierung des 0,3 kb PR206-PR207 EcoRI-XhoI Fragmentes aus pTA-LB3, abgeleitet vom Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen), und Ligierung mit dem EcoRI-XhoI geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den 0,3 kb

- 40 Terminator LB3 enthält, heisst pCSP02.

Der zweite Klonierungsschritt erfolgt durch Isolierung des 0,9 kb VPR003-PR215 EcoRI-HindIII Fragmentes aus pTA-CrtR-b2, abgeleitet vom Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen), und Ligierung mit dem EcoRI-HindIII geschnittenen Vektor pCSP02. Der Klon, der das 0,9 kb B-Hydroxylase-Fragment CrtR-b2 enthält, heisst pCSP03.

45

Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem Terminator LB3 und dem B-Hydroxylase-Fragment CrtR-b2.

Der dritte Klonierungsschritt erfolgt durch Isolierung des 1,8 kb  
 5 VPR001-VPR002 NcoI-SacI Fragmentes aus pTA-EPSPS, abgeleitet vom  
 Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen), und Ligierung mit dem  
 NcoI-SacI geschnittenen Vektor pCSP03. Der Klon, der das 1,8 kb  
 EPSPS Promoter-Fragment enthält, heisst pCSP04. Durch die Liga-  
 tion entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem EPSPS-  
 10 Promoter und dem  $\beta$ -Hydroxylase-Fragment CrtR-b2. (Abbildung 35,  
 Konstruktkarte). In der Abbildung 35 beinhaltet Fragment Fragment  
 , EPSPS (1792 bp) den EPSPS Promoter, das Fragment *crtRb2*  
 (929 bp) die B-Hydroxylase CrtRb2, Fragment LB3 (301 bp) den LB3  
 Terminator.

15 Zur Klonierung dieser  $\beta$ -Hydroxylase-Überexpressionskassette in  
 Expressionsvektoren für die Agrobacterium-vermittelte Transforma-  
 tion von *Tagetes erecta* wird die  $\beta$ -Hydroxylase-Kassette als 3103  
 bp Ecl136II-XhoI Fragmentes isoliert. Das Auffüllen der 3'Enden  
 20 (30 min bei 30°C) erfolgt nach Standardmethoden (Klenow-fill-in).

#### Beispiel 32:

Herstellung von Inverted-Repeat-Expressionskassetten für die blü-  
 tenspezifische Expression von b-Hydroxylase dsRNA in *Tagetes*  
 25 *erecta* (gerichtet gegen die 5'Region der b-Hydroxylase cDNA)

Die Nukleinsäure, die die 5'terminale bp Region der b-Hydroxylase  
 cDNA (Genbank accession no. AF251018) enthält, wird mittels  
 polymerase chain reaction (PCR) aus *Tagetes erecta* cDNA unter  
 30 Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR217 SEQ ID  
 No. 153) und eines antisense spezifischen Primers (PR218 SEQ ID  
 No. 154) amplifiziert.

Für die Präparation von Total-RNA aus Blüten von *Tagetes* werden  
 35 100 mg der gefrorenen, pulverisierten Blüten in ein Reaktions-  
 gefäß überführt und in 0,8 ml Trizol-Puffer (LifeTechnologies)  
 aufgenommen. Die Suspension wird mit 0,2 ml Chloroform extra-  
 hiert. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 12 000 g wurde der  
 wässrige Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß  
 40 überführt und mit einem Volumen Ethanol extrahiert. Die RNA wird  
 mit einem Volumen Isopropanol gefällt, mit 75 % Ethanol gewaschen  
 und das Pellet in DEPC Wasser (über Nacht Inkubation von Wasser  
 mit 1/1000 Volumen Diethylpyrocarbonat bei Raumtemperatur, an-  
 schließend autoklaviert) gelöst. Die RNA-Konzentration wird  
 45 photometrisch bestimmt. Für die cDNA-Synthese werden 2,5  $\mu$ g  
 Gesamt-RNA für 10 min bei 60°C denaturiert, für 2 min auf Eis  
 abgekühlt und mittels eines cDNA-Kits (Ready-to-go-you-prime-

178

beads, Pharmacia Biotech) nach Herstellerangaben unter Verwendung eines antisense spezifischen Primers (PR218 SEQ ID No. 154) in cDNA umgeschrieben.

5 Die Bedingungen der anschließenden PCR-Reaktionen sind die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR217-PR218 DNA-Fragmentes, das die 5'terminale 0.3 kb Region der b-Hydroxylase enthält, erfolgt in  
10 einem 50 ul? Reaktionsansatz, in dem enthalten ist:

- 1 ul? cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 uM PR217 (SEQ ID No. 153)
- 15 - 0.2 uM PR218 (SEQ ID No. 154)
- 5 ul? 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ul? R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ul? Aq. Dest.

20 Die PCR zur Amplifikation des PR220-PR219 DNA-Fragmentes, das die 5'terminale 0,3kb Region der b-Hydroxylase enthält, erfolgt in einem 50 ul Reaktionsansatz, in dem enthalten ist:

- 1 ul cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 25 - 0.25 mM dNTPs
- 0.2 uM PR220 (SEQ ID No. 156)
- 0.2 uM PR219 (SEQ ID No. 155)
- 5 ul 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ul R Taq Polymerase (TAKARA)
- 30 - 28.8 ul Aq. Dest.

Die PCR-Reaktionen werden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- |    |     |      |            |
|----|-----|------|------------|
| 35 | 1X  | 94°C | 2 Minuten  |
|    | 35X | 94°C | 1 Minute   |
|    |     | 58°C | 1 Minuten  |
|    |     | 72°C | 1 Minuten  |
|    | 1X  | 72°C | 10 Minuten |

40

Die PCR-Amplifikation mit Primer PR217 und PR218 resultiert in einem 332 Bp-Fragment (SEQ ID NO: 163), die PCR-Amplifikation mit Primer PR219 und PR220 resultiert in einem 332 Bp-Fragment (SEQ ID NO: 164).

45

## 179

Die beiden Amplifikate, das PR217-PR218 (HindIII-SalI sense) Fragment und das PR220-PR219 (EcoRI-BamHI antisense) Fragment, werden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Die resultierenden  
 5 Klone heißen pCR-BluntII-bhydrS (PR217-PR218-Fragment) bzw. pCR-BluntII-bhydrAS (PR220-PR219-Fragment). Sequenzierungen mit dem Primer SP6 bestätigen jeweils eine zur publizierten Sequenz AF251018 (SEQ ID No. 165) identische Sequenz abgesehen von den eingeführten Restriktionsstellen. Diese Klone werden daher für  
 10 die Herstellung eines Inverted-Repeat Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJAI1 (siehe Beispiel 10) verwendet.

Der erste Klonierungsschritt erfolgt durch Isolierung des 332 Bp PR217-PR218 HindIII-SalI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor  
 15 pCR-BluntII-bhydrS (Invitrogen) und Ligierung mit dem HindIII-SalI geschnittenen Vektor pJAI1. Der Klon, der 5' terminale Region der P-Hydroxylase in der sense Orientierung enthält, heisst pCSP05. Durch die Ligation entsteht eine ttranskriptionelle Fusion zwischen dem AP3P und dem sense Fragment der 5' terminalen  
 20 Region der  $\beta$ -Hydroxylase sowie dem Intron andererseits.

Der zweite Klonierungsschritt erfolgt durch Isolierung des 332 Bp PR220-PR219 BamHI-EcoRI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII-bhydrAS (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-EcoRI  
 25 geschnittenen Vektor pCSP05. Der Klon, der die 332 bp 5' terminale Region der  $\beta$ -Hydroxylase cDNA in der antisense Orientierung enthält, heisst pCSP06. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem antisense Fragment der 5' terminalen Region der  $\beta$ -Hydroxylase und dem Polyadenylierungssignal aus CaMV  
 30 einerseits und dem Intron andererseits.

Zur Klonierung dieser Runterregulierungskassette in Expressionsvektoren für die Agrobacterium-vermittelte Transformation von *Tagetes erecta* wird die Inverted-Repeat-Kassette als 2394 bp  
 35 Ecl136II-XhoI Fragmentes isoliert. Das Auffüllen der 3' Enden (30 min bei 30°C) erfolgt nach Standardmethoden (Klenow-fill-in).

In der Abbildung 36 beinhaltet Fragment AP3P (767 bp) den AP3P-Promoter, Fragment 5'bhydrS (291 bp) die 5' Region der B-Hydroxylase aus *Tagetes erecta* in Sense-Orientierung, Fragment intron (206 bp) das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment 5'bhydrS (326 bp) die 5' Region der B-Hydroxylase aus *Tagetes erecta* in Antisense-Orientierung, und Fragment 35T (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.  
 45

## 180

Zur Klonierung dieser Runterregulierungskassette in Expressionsvektoren für die Agrobacterium-vermittelte Transformation von *Tagetes erecta* wird die Inverted-Repeat-Kassette als 2392 bp Ecl136II-XhoI Fragmentes isoliert. Das Auffüllen der 3'Enden  
 5 (30 min bei 30°C) erfolgt nach Standardmethoden (Klenow-fill-in).

Beispiel 33:

Herstellung eines Dreifach-Expressionsvektors zur Runterregulierung der Epsilon-Cyclase, der Expression der *Nostoc punctiforme*  
 10 Ketolase NP196-1, sowie der Überexpression der chromoplastenspezifischen B-Hydroxylase aus *Lycopersicon esculentum* blütenspezifisch in *Tagetes erecta*.

Die Klonierung dieses Dreifach-Expressionsvektors erfolgt durch  
 15 Isolierung des 3103 Bp Ecl136II-XhoI Fragmentes aus pCSP04 (siehe Beispiel 31), nachfolgendes Klenow-Auffüllen des 5'Überhangs der XhoI Schnittstelle (nach Standardmethoden durchgeführt) und schliesslich Ligierung in dem Ecl136II-geschnittenen Vektor pCSP01 (Beispiel 30). Durch die Ligation entsteht eine T-DNA die  
 20 drei Expressionskassetten enthaelt: erstens die Inverted-Repeat-Cassette gerichtet gegen die Ecyclase aus *Tagetes erecta*, zweitens eine Kassette zur Überexpression der Ketolase NP196-1 aus *Nostoc punctiforme*, und drittens eine Kassette zur chromoplastenspezifischen Überexpression der B-Hydroxylase aus *Lycopersicon*  
 25 *esculentum*. Die  $\beta$ -Hydroxylase-Überexpressions-kassette kann in zwei Orientierungen in den Vektor ligieren. Das hier beschriebene Beispiel pCSP07 beinhaltet beide resultierenden Versionen pCSP07F und pCSP07R des Dreifach-Expressionsvektors.

30 Stellvertretend ist hier die Konstruktkarte fuer Version pCSP07F des Beispiels pCSP07 angeben (Abbildung 37, Konstruktkarte).

In der Abbildung 37 beinhaltet Fragment AP3P (773 bp) den AP3P-Promoter, Fragment *ecycS* (439 bp) die 5'Region der Ecyclase  
 35 Sequenz aus *Tagetes erecta* in Sense-Orientierung, Fragment *intron* (207 bp) das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment *ecycAS* (440 bp) die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* in Antisense-Orientierung, Fragment 35T (763 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.  
 40

Weiterhin beinhaltet Fragment *ocs* (191 bp) das Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthasegens, Fragment NP196 (762 bp) die Ketolase aus *Nostoc punctiforme*, Fragment TP (183 bp) das Trans-  
 45 itpeptid des *rbcS* Gens aus Erbse, Fragment EPSPS (1761 bp) den EPSPS Promoter.

Weiterhin beinhaltet Fragment *EPSPS* (1792 bp) den *EPSPS* Promoter, das Fragment *crtRb2* (929 bp) die B-Hydroxylase *CrtRb2*, Fragment *LB3* (301 bp) den *LB3* Terminator.

5 Transformation und Regeneration von *Tagetes*-pflanzen wurde in Beispiel 7 beschrieben.

Beispiel 34:

Herstellung eines Vierfach-Expressionsvektors zur Runterregulierung der Epsilon-Cyclase, der Expression der *Nostoc punctiforme* Ketolase NP196-1, der Überexpression der chromoplastenspezifischen B-Hydroxylase aus *Lycopersicon esculentum* sowie der Runterregulierung der B-Hydroxylase aus *Tagetes erecta* blütenspezifisch in *Tagetes erecta*.

15 Die Klonierung dieses Vierfach-Expressionsvektors erfolgt durch Isolierung des 2392 Bp *Ecl136II*-*XhoI* Fragmentes aus pCSP06 (siehe Beispiel 32), nachfolgendes Klenow-Auffuellen des 5'Überhangs der *XhoI*-Schnittstelle (nach Standardmethoden durchgeführt) und schliesslich Ligierung in dem *Ecl136II*-geschnittenen Vektor pCSP07 (Beispiel 33). Durch die Ligation entsteht eine T-DNA die vier Expressionskassetten enthaelt: erstens die Inverted-Repeat-Cassette gerichtet gegen die Ecyclase aus *Tagetes erecta*, zweitens eine Kassette zur Überexpression der Ketolase NP196-1 aus *Nostoc punctiforme*, drittens eine Kassette zur chromoplastenspezifischen Überexpression der B-Hydroxylase aus *Lycopersicon esculentum*, und viertens eine Inverted-Repeat-Kassette gerichtet gegen die B-Hydroxylase aus *Tagetes erecta*. Die B-Hydroxylase-Runterregulierungs-Kassette kann in zwei Orientierungen in den Vektor ligieren. Das hier beschriebene Beispiel pCSP08 beinhaltet beide resultierenden Versionen pCSP08F und pCSP08R des Vierfach-Expressionsvektors.

Stellvertretend ist hier die Konstruktkarte fuer Version pCSP08F des Beispiels pCSP08 angeben (Abbildung 38, Konstruktkarte). In der Abbildung 38 beinhaltet Fragment *AP3P* (773 bp) den *AP3P*-Promoter, Fragment *ecycS* (439 bp) die 5'Region der Ecyclase Sequenz aus *Tagetes erecta* in Sense-Orientierung, Fragment *intron* (207 bp) das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens *ST-LS1*, Fragment *ecycAS* (440 bp) die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* in Antisense-Orientierung, Fragment *35T* (763 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

Weiterhin beinhaltet Fragment *ocs* (191 bp) das Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthasegens, Fragment *NP196* (762 bp) die Ketolase aus *Nostoc punctiforme*, Fragment *TP* (183 bp) das

## 182

Transitpeptid des *rbcS* Gens aus Erbse, Fragment *EPSPS* (1761 bp) den *EPSPS* Promoter.

Weiterhin beinhaltet Fragment *EPSPS* (1792 bp) den *EPSPS* Promoter, 5 das Fragment *crtRb2* (929 bp) die B-Hydroxylase *CrtRb2*, Fragment *LB3* (301 bp) den *LB3* Terminator.

Weiterhin beinhaltet Fragment *AP3P* (767 bp) den *AP3P*-Promoter, Fragment *5'bhydrS* (291 bp) die 5'-Region der B-Hydroxylase aus 10 *Tagetes erecta* in Sense-Orientierung, Fragment *intron* (206 bp) das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens *ST-LS1*, Fragment *5'bhydrS* (326 bp) die 5'-Region der B-Hydroxylase aus *Tagetes erecta* in Antisense-Orientierung, und Fragment *35T* (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von *CaMV*.

15

Beispiel 35:

Herstellung eines Fuenffach-Expressionsvektors zur Runterregulierung der Epsilon-Cyclase, der Expression der *Nostoc punctiforme* Ketolase NP196-1, der Überexpression der chromoplastenspezi- 20 fischen B-Hydroxylase aus *Lycopersicon esculentum* der Runterregulierung der B-Hydroxylase aus *Tagetes erecta* sowie der Überexpression der Bgenes aus Tomate blütenspezifisch in *Tagetes erecta*.

25 Die Klonierung dieses Fuenffach-Expressionsvektors erfolgt durch Isolierung des 2679 Bp *PmeI*-*SspI* Fragmentes aus *pMKP1* (siehe Beispiel 37) und Ligierung in dem *Ecl136II*-geschnittenen Vektor *pCSP08* (Beispiel 34). Durch die Ligation entsteht eine T-DNA die fuenf Expressionskassetten enthaelt: erstens die Inverted-Repeat-

30 Cassette gerichtet gegen die *Ecyclase* aus *Tagetes erecta*, zweitens eine Cassette zur Überexpression der Ketolase NP196-1 aus *Nostoc punctiforme*, drittens eine Cassette zur Überexpression der chromoplastenspezifischen  $\beta$ -Hydroxylase aus *Lycopersicon esculentum*, viertens eine Inverted-Repeat-Kassette gerichtet gegen die

35 B-Hydroxylase aus *Tagetes erecta*, und fuenftens eine Cassette zur Überexpression des Bgenes aus *Lycopersicon esculentum*. Die B-Hydroxylase-Runterregulierungs-Kassette kann in zwei Orientierungen in den Vektor *pCSP08* ligieren. Das hier beschriebene Beispiel *pCSP09* beinhaltet beide resultierenden Versionen *pCSP09F*

40 und *pCSP09R* des Vierfach-Expressionsvektors.

Stellvertretend ist hier die Konstruktkarte fuer Version *pCSP09F* des Beispiels *pCSP09* angeben (Abbildung 39, Konstruktkarte).

In der Abbildung 39 beinhaltet Fragment *AP3P* (773 bp) den *AP3P*- 45 Promoter, Fragment *ecycS* (439 bp) die 5'-Region der *Ecyclase* Sequenz aus *Tagetes erecta* in Sense-Orientierung, Fragment *intron* (207 bp) das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens *ST-LS1*, Fragment



## 183

ecycAS (440 bp) die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* in Antisense-Orientierung, Fragment 35T (763 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

5 Weiterhin beinhaltet Fragment ocs (191 bp) das Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthasegens, Fragment NP196 (762 bp) die Ketolase aus *Nostoc punctiforme*, Fragment TP (183 bp) das Transitpeptid des rbcS Gens aus Erbse, Fragment EPSPS (1761 bp) den EPSPS Promoter.

10

Weiterhin beinhaltet Fragment EPSPS (1792 bp) den EPSPS Promoter, das Fragment crtRb2 (929 bp) die B-Hydroxylase CrtRb2, Fragment LB3 (301 bp) den LB3 Terminator.

15 Weiterhin beinhaltet Fragment AP3P (767 bp) den AP3P-Promoter, Fragment 5'bhydrS (291 bp) die 5'Region der B-Hydroxylase aus *Tagetes erecta* in Sense-Orientierung, Fragment intron (206 bp) das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment 5'bhydrS (326 bp) die 5'Region der B-Hydroxylase aus *Tagetes erecta* in Antisense-  
20 Orientierung, und Fragment 35T (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

Weiterhin beinhaltet das Fragment P76 (1033 bp) den P76 Promoter, das Fragment Bgene (1666 bp) das Bgene aus *Lycopersicon esculen-*  
25 tum, und das Fragment 35ST (970 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

## Beispiel 36:

Herstellung eines Vierfach-Expressionsvektors zur der Expression  
30 der *Nostoc punctiforme* Ketolase NP196-1, der Überexpression der chromoplastenspezifischen B-Hydroxylase aus *Lycopersicon esculen-*  
tum, der Runterregulierung der B-Hydroxylase aus *Tagetes erecta* sowie der Ueberexpression der Bgenes aus Tomate blütenspezifisch in *Tagetes erecta*.

35

Der erste Klonierungsschritt erfolgt durch Isolierung des 3103 bp Ecl136II-XhoI Fragmentes aus pCSP04, nachfolgendes Klenow-Auf-  
fuellen des 5'Ueberhangs der XhoI-Schnittstelle (nach Standard-  
methoden durchgefuehrt) und schliesslich Ligierung in den  
40 Ecl136II-geschnittenen Vektor pMSP107. Durch die Ligation ent-  
steht eine T-DNA die zwei Expressionskassetten enthaelt: erstens die Kassette zur Ueberexpression der Ketolase NP196-1 aus *Nostoc punctiforme*, und zweitens die Kassette zur Ueberexpression der chromoplastenspezifischen  $\beta$ -Hydroxylase aus *Lycopersicon esculen-*  
45 tum. Die  $\beta$ -Hydroxylase-Ueberexpressions-Kassette kann in zwei Orientierungen in den Vektor pMSP107 ligieren. Das hier beschrie-

beine Beispiel pCSP010 beinhaltet beide resultierenden Versionen pCSP10F und pCSP10R des Zweifach-Expressionsvektors.

Der zweite Klonierungsschritt erfolgt durch Isolierung des 2392  
 5 bp *Ecl136II*-*XhoI* Fragmentes aus pCSP06, nachfolgendes Klenow-Auf-  
 fuellen des 5' Ueberhangs der *XhoI*-Schnittstelle (nach Standard-  
 methoden durchgefuehrt) und schliesslich Ligierung in den  
*Ecl136II*-geschnittenen Vektor pCSP10. Die B-Hydroxylase-Runter-  
 regulierungs-Kassette kann in zwei Orientierungen in den Vektor  
 10 pCSP10 ligieren. Das hier beschriebene Beispiel pCSP11 beinhaltet  
 beide resultierenden Versionen pCSP11F und pCSP11R des Dreifach-  
 Expressionsvektors.

Der dritte Klonierungsschritt erfolgt durch Isolierung des 3679  
 15 bp *PmeI*-*SspI*-Fragmentes aus pMKP01 (siehe Beispiel 37) und Ligie-  
 rung in den *Ecl136II*-geschnittenen Vektor pCSP11. Die Bgene-Über-  
 expressions-Kassette kann in zwei Orientierungen in den Vektor  
 pCSP11 ligieren. Das hier beschriebene Beispiel pCSP12 beinhaltet  
 beide resultierenden Versionen pCSP12F und pCSP12R des Vierfach-  
 20 Expressionsvektors.

Stellvertretend ist hier die Konstruktkarte fuer Version pCSP12F  
 des Beispiels pCSP12 angeben (Abbildung 40, Konstruktkarte).

25 In der Abbildung 40 beinhaltet Fragment *ocs* (191 bp) das Poly-  
 adenylierungssignal des Octopin-Synthasegens, Fragment *NP196*  
 (762 bp) die Ketolase aus *Nostoc punctiforme*, Fragment *TP*  
 (183 bp) das Transitpeptid des *rbcS* Gens aus Erbse, Fragment  
*EPSPS* (1761 bp) den EPSPS Promoter.

30

Weiterhin beinhaltet Fragment *EPSPS* (1792 bp) den EPSPS Promoter,  
 das Fragment *crtR-b2* (929 bp) die B-Hydroxylase *CrtRb2*, Fragment  
*LB3* (301 bp) den LB3 Terminator.

35 Weiterhin beinhaltet Fragment *AP3P* (767 bp) den AP3P-Promoter,  
 Fragment *5'bhydrS* (291 bp) die 5'Region der B-Hydroxylase aus  
*Tagetes erecta* in Sense-Orientierung, Fragment *intron* (206 bp) das  
 Intron PIV2 des Kartoffel-Gens *ST-LS1*, Fragment *5'bhydrS* (326 bp)  
 die 5'Region der B-Hydroxylase aus *Tagetes erecta* in Antisense-  
 40 Orientierung, und Fragment *35T* (761 Bp) das Polyadenylierungs-  
 signal von CaMV.

Weiterhin beinhaltet das Fragment *P76* (1033 bp) den P76 Promoter,  
 das Fragment *Bgene* (1666 bp) das Bgene aus *Lycopersicon esculen-*  
 45 *tum*, und das Fragment *35ST* (970 Bp) das Polyadenylierungssignal  
 von CaMV.

Beispiel 37:

Herstellung von Expressionsvektoren zur blütenspezifischen Expression der chromoplastenspezifischen Lycopin beta cyclase aus *Lycopersicon esculentum* unter Kontrolle des Promoters P76 und zur blütenspezifischen Expression der Ketolase NP196 aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 unter Kontrolle des EPSPS Promoters

Isolation von Promoter P76 (SEQ ID NO. 168) mittels PCR mit genomischer DNA von *Arabidopsis thaliana* als Matrize.

Hierzu wurden die Oligonukleotid Primer P76for (SEQ ID NO. 166) und P76rev (SEQ ID NO. 167) verwendet. Die Oligonukleotide wurden bei der Synthese mit einem 5' Phosphatrest versehen.

Die genomische DNA wurde aus *Arabidopsis thaliana* wie beschrieben (Galbiati M et al. Funct. Integr. Genomics 2000, 20 1:25-34) isoliert.

Die PCR Amplifikation wurde wie folgt durchgeführt:

80 ng genomische DNA  
1x Expand Long Template PCR Puffer  
2,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
je 350 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP  
je 300 nM eines jeden Primers  
2,5 Units Expand Long Template Polymerase  
in einem Endvolumen von 25 µl

Folgendes Temperaturprogramm wird verwendet:

1 Zyklus mit 120 sec bei 94°C  
35 Zyklen mit 94°C für 10 sec, 48°C für 30 sec und 68°C für 3 min  
1 Zyklus mit 68°C für 10 min

Das PCR Produkt wird mit Agarosegelelektrophorese gereinigt und das 1032 bp Fragment durch Gelelelution isoliert.

Der Vektor pSun5 wird mit der Restriktionsendonuklease EcoRV verdaut und ebenfalls über Agarosegelelektrophorese aufgereinigt und durch Gelelelution gewonnen.

Das gereinigte PCR Produkt wird in den so behandelten Vektor kloniert.

186

Um die Orientierung des Promotors im Vektor zu überprüfen wird mit der Restriktionsendonuklease BamHI verdaut. Entsteht hierbei ein 628 bp Fragment ist die Orientierung entsprechend der Abb. 43.

5

Dieses Konstrukt wird mit p76 bezeichnet.

Der 35ST wird aus pJIT 117 durch Verdau mit den Restriktionsendonukleasen KpnI und SmaI gewonnen.

10 Das hierbei entstehende 969 bp Fragment wird mit Agarosegelelektrophorese gereinigt und durch Gelelektion isoliert.

Der Vektor p76 wird ebenfalls mit den Restriktionsendonukleasen KpnI und SmaI verdaut. Das entstehende 7276bp Fragment wird mit Agarosegelelektrophorese gereinigt und durch Gelelektion isoliert.

15 Das so gewonnene 35ST Fragment wird in den so behandelten p76 kloniert.

Der entstehende Vektor wird mit p76\_35ST bezeichnet.

Isolation von Bgene (SEQ ID NO. 171) mittels PCR mit genomischer

20 DNA von *Lycopersicon esculentum* als Matrize.

Hierzu wurden die Oligonukleotid Primer BgeneFor (SEQ ID NO. 169) und BgeneRev (SEQ ID NO. 170) verwendet. Die Oligonukleotide wurden bei der Synthese mit einem 5' Phosphatrest versehen.

25

Die genomische DNA wurde aus *Lycopersicon esculentum* wie beschrieben (Galbiati M et al. Funct. Integr. Genomics 2000, 20 1:25-34) isoliert.

30 Die PCR Amplifikation wurde wie folgt durchgeführt:

80ng genomische DNA

1x Expand Long Template PCR Puffer

2,5 mM MgCl<sub>2</sub>

35 je 350 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP

je 300 nM eines jeden Primers

2,5 Units Expand Long Template Polymerase

in einem Endvolumen von 25 µl

40 Folgendes Temperaturprogramm wurde verwendet:

1 Zyklus mit 120 sec bei 94°C

35 Zyklen mit 94°C für 10 sec, 48°C für 30 sec und 68°C für 3 min

1 Zyklus mit 68°C für 10 min

45

Das PCR Produkt wurde mit Agarosegelelektrophorese gereinigt und das 1665 bp Fragment durch Gelelution isoliert.

Der Vektor p76\_35ST wird mit der Restriktionsendonuklease SmaI 5 verdaut und ebenfalls über Agarosegelelektrophorese aufgereinigt und durch Gelelution gewonnen.

Das gereinigte PCR Produkt wird in den so behandelten Vektor kloniert.

10 Um die Orientierung von Bgene im Vektor zu überprüfen wird mit der Restriktionsendonuklease EcoRI verdaut. Entsteht hierbei ein 2216 bp Fragment ist die Orientierung entsprechend der Abb. 43. Dieses Konstrukt wird mit pB bezeichnet.

pB wird mit den Restriktionsendonukleasen PmeI und SspI verdaut 15 und das 3906bp Fragment enthaltend den Promoter P76, Bgene und den 35ST durch Agarosegelelektrophorese gereinigt und durch Gelelution gewonnen

MSP108 (Beispiel 21, Abb.25) wird mit der Restriktionsendo- 20 nuklease Ecl126II verdaut, durch Agarosegelelektrophorese gereinigt und durch Gelelution gewonnen

Das gereinigte 3906bp Fragment enthaltend den Promoter P76, Bgene und den 35ST aus pB wird in den so behandelten Vector 25 MSP108 kloniert.

Die Orientierung des Inserts wird durch Restriktionsverdau mit NcoI festgestellt. Entsteht hierbei ein Fragment der Größe 5268bp, ist die Orientierung wie in Abb. XX gezeigt. Dieses Konstrukt wird mit pMKP1 (Abb.44) bezeichnet.

30

Beispiel 38:

Herstellung von Expressionsvektoren zur blütenspezifischen Expression der chromoplastenspezifischen Lycopin beta cyclase aus *Lycopersicon esculentum* unter Kontrolle des Promoters P76, 35 zur blütenspezifischen Expression der Ketolase NP196 aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 unter Kontrolle des EPSPS Promoters und zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend 5'terminale Fragmente der Epsilon-Cyclase cDNA (AF251016) unter Kontrolle des AP3P-Promoters

40

Vektor csp1 (Abb. 34, Beispiel 30) wird mit Ecl136II verdaut und mittels Agarosegelelektrophorese gereinigt und durch Gelelution gewonnen.

45 Das 3906bp SspI, PmeI Fragment enthaltend den Promoter P76, Bgene und den 35ST aus pB (siehe Beispiel 37) wird in den so behandelten Vector csp1 kloniert.

188

Die Orientierung des Inserts wird durch Restriktionsverdau mit SacI festgestellt. Entsteht hierbei ein Fragment der Größe 3170bp, ist die Orientierung wie in Abb. XX gezeigt.

5 Dieses Konstrukt wird mit pMKP2 (Abb. 44) bezeichnet.

Beispiel 39:

Herstellung und Charakterisierung transgener Tagetes Pflanzen

10 Die Transformation und Regeneration von Tagetes Pflanzen unter Verwendung der Nukleinsäurekonstrukte gemäß den Beispielen 30 bis 38 wurde wie in Beispiel 7 beschrieben durchgeführt.

Die Charakterisierung der transgenen Tagetes Pflanzen erfolgt

15 wie unter Beispiel 8 und 9 sowie wie in Beispiel 17 beschrieben.

20

25

30

35

40

45

## Patentansprüche

- 5 1. Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern aufweisen.
- 10 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man Pflanzen verwendet, deren Blütenblätter als Wildtyp bereits eine Ketolase-Aktivität aufweisen und die genetische Veränderung eine Erhöhung der Ketolase-Aktivität in Blütenblättern im Vergleich zum Wildtyp bewirkt.
- 15 3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der Ketolase-Aktivität die Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, gegenüber dem Wildtyp erhöht.
- 20 4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der Genexpression Nukleinsäuren in die Pflanze einbringt, die Ketolasen kodieren.
- 25 5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man Pflanzen verwendet, deren Blütenblätter als Wildtyp keine Ketolase-Aktivität aufweisen und die genetische Veränderung eine Ketolase-Aktivität in Blütenblättern im Vergleich zum Wildtyp verursacht.
- 30 6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass man genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in Blütenblättern transgen eine Ketolase exprimieren.
- 35 7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Verursachung der Genexpression Nukleinsäuren in die Pflanze einbringt, die Ketolasen kodieren.
- 40 8. Verfahren nach Anspruch 4 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren einbringt, die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase
- 45 aufweist.

## 190

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 1 einbringt.
- 5 10. Verfahren nach Anspruch 4 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren einbringt, die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 16 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz  
10 SEQ ID NO: 16 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase aufweist.
- 15 11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 15 einbringt.
- 20 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass man genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in Blüten die höchste Expressionsrate einer Ketolase aufweisen.
- 25 13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Genexpression der Ketolase unter Kontrolle eines blüten-spezifischen Promotors erfolgt.
- 30 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Pflanzen zusätzlich gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Hydroxylase-Aktivität und  $\beta$ -Cyclase-Aktivität aufweisen.
- 35 15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass man zur zusätzlichen Erhöhung mindestens einer der Aktivitäten, die Genexpression mindestens einer Nukleinsäure ausgewählt aus der Gruppe, Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxylase und Nukleinsäuren kodierend eine  $\beta$ -Cyclase gegenüber dem Wildtyp erhöht.
- 40 16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der Genexpression mindestens einer der Nukleinsäuren, mindestens eine Nukleinsäure ausgewählt aus der Gruppe, Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxylase und Nukleinsäuren kodierend eine  $\beta$ -Cyclase in die Pflanze einbringt.
- 45 17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure kodierend eine Hydroxylase, Nukleinsäuren einbringt die eine Hydroxylase kodieren, enthaltend die



191

Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 18 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 18 aufweist.

5

18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 17 einbringt.

10 19. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure kodierend eine  $\beta$ -Cyclase, Nukleinsäuren einbringt die eine  $\beta$ -Cyclase kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 20 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 20 aufweist.

15

20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 19 einbringt.

20

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass man genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in Blüten die höchste Expressionsrate einer Hydroxylase und/oder  $\beta$ -Cyclase aufweisen.

25

22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Genexpression der Hydroxylase und/oder  $\beta$ -Cyclase unter Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors erfolgt.

30

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Pflanzen gegenüber dem Wildtyp zusätzlich eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität aufweisen.

35 24. Verfahren nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass man die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität in Pflanzen durch mindestens eines der nachfolgenden Verfahren erreicht:

a) Einbringen mindestens einer doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen,

40

b) Einbringen mindestens einer  $\epsilon$ -Cyclase antisense-Ribonukleinsäuresequenzen oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette in Pflanzen,

45

- 5 c) Einbringen mindestens einer  $\epsilon$ -Cyclase antisense-Ribonukleinsäuresequenz kombiniert mit einem Ribozym oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen,
- 10 d) Einbringen mindestens einer  $\epsilon$ -Cyclase sense-Ribonukleinsäuresequenzen zur Induktion einer Kosuppression oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette in Pflanzen,
- 15 e) Einbringen mindestens eines DNA-oder Protein-bindenden Faktors gegen ein  $\epsilon$ -Cyclase -Gen, -RNA oder -Protein oder einer dessen Expression gewährleistenden Expressionskassette in Pflanzen,
- f) Einbringen mindestens einer den  $\epsilon$ -Cyclase RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette in Pflanzen,
- 20 g) Einbringen mindestens eines Konstruktes zur Erzeugung einer Insertion, Deletion, Inversion oder Mutation in einem  $\epsilon$ -Cyclase-Gen in Pflanzen.
- 25 25. Verfahren nach Anspruch 24, Ausführungsform a), dadurch gekennzeichnet, dass man in die Pflanze eine RNA einbringt, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die
- 30 a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Transkripts identisch ist und/oder
- b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist.
- 35 26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass der Bereich mit Doppel-Strang-Struktur eine Nukleinsäuresequenz enthält, die mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Transkripts identisch ist und das 5'-Ende oder das 3'-Ende der Pflanze eigenen Nukleinsäure, kodierend eine  $\epsilon$ -Cyclase enthält.
- 40 27. Verfahren nach Anspruch 23 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass man genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in Blüten die geringste Expressionsrate einer  $\epsilon$ -Cyclase aufweisen.
- 45 28. Verfahren nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, dass die Transkription der doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 24, Ausführungsform a) und/oder

der Antisense-Sequenzen gemäß Anspruch 24, Ausführungsform b) unter Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors erfolgt.

29. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 28, dadurch gekennzeichnet, dass die Pflanzen zusätzlich gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität, Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase-Aktivität, Geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Geranyl-geranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Phytoen-Synthase-Aktivität, Phytoen-Desaturase-Aktivität, Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität, crtISO-Aktivität, FtsZ-Aktivität und MinD-Aktivität aufweisen.
30. Verfahren nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, dass man zur zusätzlichen Erhöhung mindestens einer der Aktivitäten, die Genexpression mindestens einer Nukleinsäure ausgewählt aus der Gruppe, Nukleinsäuren kodierend eine HMG-CoA-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase, Nukleinsäuren kodierend eine Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase, Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Diphosphat-Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine Phytoen-Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine Phytoen-Desaturase, Nukleinsäuren kodierend eine Zeta-Carotin-Desaturase, Nukleinsäuren kodierend ein crtISO Protein, Nukleinsäuren kodierend ein FtsZ Protein und Nukleinsäuren kodierend ein MinD Protein gegenüber dem Wildtyp erhöht.
31. Verfahren nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der Genexpression mindestens einer der Nukleinsäuren, mindestens eine Nukleinsäure ausgewählt aus der Gruppe, Nukleinsäuren kodierend eine HMG-CoA-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase, Nukleinsäuren kodierend eine Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase, Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Diphosphat-Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase,

## 194

- Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine Phytoen-Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine Phytoen-Desaturase, Nukleinsäuren kodierend eine Zeta-Carotin-Desaturase, Nukleinsäuren kodierend ein crtISO Protein, Nukleinsäuren kodierend ein FtsZ Protein und Nukleinsäuren kodierend ein MinD Protein in die Pflanze einbringt.
32. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure kodierend eine HMG-CoA-Reduktase, Nukleinsäuren einbringt die eine HMG-CoA-Reduktase kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 100 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 100 aufweist.
33. Verfahren nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 99 einbringt.
34. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase, Nukleinsäuren einbringt die eine (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 102 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 102 aufweist.
35. Verfahren nach Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 101 einbringt.
36. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase, Nukleinsäuren einbringt die eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 104 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 104 aufweist.
37. Verfahren nach Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 103 einbringt.

38. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase, Nukleinsäuren einbringt die eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 106 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 106 aufweist.
39. Verfahren nach Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 105 einbringt.
40. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure kodierend eine Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase, Nukleinsäuren einbringt die eine Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 108 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 108 aufweist.
41. Verfahren nach Anspruch 40, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 107 einbringt.
42. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure kodierend eine Geranyl-Diphosphat-Synthase, Nukleinsäuren einbringt die eine Geranyl-Diphosphat-Synthase kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 110 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 110 aufweist.
43. Verfahren nach Anspruch 42, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 106 einbringt.
44. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure kodierend eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase, Nukleinsäuren einbringt die eine Farnesyl-Diphosphat-Synthase kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 112 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 112 aufweist.

45. Verfahren nach Anspruch 44, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 111 einbringt.
- 5 46. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure kodierend eine Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase, Nukleinsäuren einbringt die eine Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 114 oder eine von dieser Sequenz durch  
10 Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 114 aufweist.
- 15 47. Verfahren nach Anspruch 46, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 113 einbringt.
- 20 48. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure kodierend eine Phytoen-Synthase, Nukleinsäuren einbringt die eine Phytoen-Synthase kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 116 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz  
25 SEQ ID NO: 116 aufweist.
- 30 49. Verfahren nach Anspruch 48, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 115 einbringt.
- 35 50. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure kodierend eine Phytoen-Desaturase, Nukleinsäuren einbringt die eine Phytoen-Desaturase kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 118 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz  
SEQ ID NO: 118 aufweist.
- 40 51. Verfahren nach Anspruch 50, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 117 einbringt.
- 45 52. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure kodierend eine Zeta-Carotin-Desaturase, Nukleinsäuren einbringt die eine Zeta-Carotin-Desaturase kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 120

## 197

oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 120 aufweist.

5

53. Verfahren nach Anspruch 52, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 119 einbringt.

10 54. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure kodierend ein crtISO Protein, Nukleinsäuren einbringt die ein crtISO Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 122 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 %  
15 auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 122 aufweist.

55. Verfahren nach Anspruch 54, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 121 einbringt.  
20

56. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure kodierend ein FtsZ Protein, Nukleinsäuren einbringt die ein FtsZ Protein kodieren, enthaltend die  
25 Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 124 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 124 aufweist.

30 57. Verfahren nach Anspruch 56, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 123 einbringt.

58. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass man  
35 als Nukleinsäure kodierend ein MinD Protein, Nukleinsäuren einbringt die ein MinD Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 126 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 %  
40 auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 126 aufweist.

59. Verfahren nach Anspruch 58, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 125 einbringt.

45

60. Verfahren nach einem der Ansprüche 29 bis 59, dadurch gekennzeichnet, dass man genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in Blüten die höchste Expressionsrate einer HMG-CoA-Reduktase und/oder (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase und/oder Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase und/oder Geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder Farnesyl-Diphosphat-Synthase und/oder Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder Phytoen-Synthase und/oder Phytoen-Desaturase und/oder Zeta-Carotin-Desaturase und/oder eines crtISO Proteins und/oder eines FtsZ Proteins und/oder eines MinD Proteins aufweisen.
61. Verfahren nach Anspruch 60, dadurch gekennzeichnet, dass die Genexpression der HMG-CoA-Reduktase und/oder (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase und/oder 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase und/oder Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase und/oder Geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder Farnesyl-Diphosphat-Synthase und/oder Geranyl-Geranyl-Diphosphat-Synthase und/oder Phytoen-Synthase und/oder Phytoen-Desaturase und/oder Zeta-Carotin-Desaturase und/oder des crtISO Proteins und/oder des FtsZ Proteins und/oder des MinD Proteins unter Kontrolle eines blüten-spezifischen Promotors erfolgt.
62. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 61, dadurch gekennzeichnet, dass die Pflanzen gegenüber dem Wildtyp zusätzlich eine reduzierte endogene  $\beta$ -Hydroxylase Aktivität aufweisen.
63. Verfahren nach Anspruch 62, dadurch gekennzeichnet, dass man die Reduzierung der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase Aktivität in Pflanzen durch mindestens eines der nachfolgenden Verfahren erreicht:
- Einbringen mindestens einer doppelsträngigen endogenen  $\beta$ -Hydroxylase Ribonukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen,
  - Einbringen mindestens einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase antisense-Ribonukleinsäuresequenzen oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette in Pflanzen,



- 5 c) Einbringen mindestens einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase antisense-Ribonukleinsäuresequenz kombiniert mit einem Ribozym oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen,
- 10 d) Einbringen mindestens einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase sense-Ribonukleinsäuresequenzen zur Induktion einer Kosuppression oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette in Pflanzen,
- 15 e) Einbringen mindestens eines DNA-oder Protein-bindenden Faktors gegen ein endogenes  $\beta$ -Hydroxylase-Gen, -RNA oder -Protein oder einer dessen Expression gewährleistenden Expressionskassette in Pflanzen,
- 20 f) Einbringen mindestens einer den endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette in Pflanzen,
- g) Einbringen mindestens eines Konstruktes zur Erzeugung einer Insertion, Deletion, Inversion oder Mutation in einem endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Gen in Pflanzen.
- 25 64. Verfahren nach Anspruch 63, Ausführungsform a), dadurch gekennzeichnet, dass man in die Pflanze eine RNA einbringt, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die
- a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen, endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Transkripts identisch ist und/oder
- 30 b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen, endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Promotor-Sequenz identisch ist.
- 35 65. Verfahren nach Anspruch 64, dadurch gekennzeichnet, dass der Bereich mit Doppel-Strang-Struktur eine Nukleinsäuresequenz enthält, die mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen, endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Transkripts identisch ist und das 5'-Ende oder das 3'-Ende der Pflanze eigenen Nukleinsäure, kodierend eine endogene  $\beta$ -Hydroxylase enthält.
- 40 66. Verfahren nach Anspruch 62 bis 65, dadurch gekennzeichnet, dass man genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in Blüten die geringste Expressionsrate einer endogenen  $\beta$ -Hydroxylase aufweisen.

## 200

67. Verfahren nach Anspruch 66, dadurch gekennzeichnet, dass die Transkription der doppelsträngigen endogenen  $\beta$ -Hydroxylase Ribonukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 63, Ausführungsform a) und/oder der Antisense-Sequenzen gemäß Anspruch 63, Ausführungsform b) unter Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors erfolgt.
68. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 67, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanze eine Pflanze verwendet, die in Blütenblättern Chromoplasten aufweist.
69. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 68, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanze eine Pflanze, ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassiceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Illiaceae oder Lamiaceae verwendet.
70. Verfahren nach Anspruch 65, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanze eine Pflanze, ausgewählt aus den Pflanzengattungen Marigold, Tagetes erecta, Tagetes patula, Acacia, Aconitum, Adonis, Arnica, Aquilegia, Aster, Astragalus, Bignonia, Calendula, Caltha, Campanula, Canna, Centaurea, Cheiranthus, Chrysanthemum, Citrus, Crepis, Crocus, Curcubita, Cytisus, Delonia, Delphinium, Dianthus, Dimorphotheca, Doronicum, Eschscholtzia, Forsythia, Fremontia, Gazania, Gelsemium, Genista, Gentiana, Geranium, Gerbera, Geum, Grevillea, Helenium, Helianthus, Hepatica, Heracleum, Hisbiscus, Heliopsis, Hypericum, Hypochoeris, Impatiens, Iris, Jacaranda, Kerria, Laburnum, Lathyrus, Leontodon, Lilium, Linum, Lotus, Lycopersicon, Lysimachia, Marattia, Medicago, Mimulus, Narcissus, Oenothera, Osmanthus, Petunia, Photinia, Physalis, Phyteuma, Potentilla, Pyracantha, Ranunculus, Rhododendron, Rosa, Rudbeckia, Senecio, Silene, Silphium, Sinapsis, Sorbus, Spartium, Tecoma, Torenia, Tragopogon, Trollius, Tropaeolum, Tulipa, Tussilago, Ulex, Viola oder Zinnia verwendet.
71. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 70, dadurch gekennzeichnet, dass man nach dem Kultivieren die genetisch veränderten Pflanzen erntet und anschließend die Ketocarotinoide aus den Blütenblättern der Pflanzen isoliert.

## 201

72. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 71, dadurch gekenn-  
zeichnet, dass die Ketocarotinoide ausgewählt sind aus der  
Gruppe Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxy-  
echinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin und Adonixanthin.
- 5 73. Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend funktionell verknüpft einen  
blütenspezifischen Promotor und eine Nukleinsäure codierend  
eine Ketolase.
- 10 74. Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend funktionell verknüpft  
einen blütenblattspezifischen Promotor und eine Nukleinsäure  
codierend eine Ketolase.
- 15 75. Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend mindestens eine Nuklein-  
säure kodierend eine Ketolase und zusätzlich mindestens eine  
weitere Nukleinsäure, ausgewählt aus der Gruppe
- a) Nukleinsäuren kodierend eine  $\beta$ -Cyclase,
  - b) Nukleinsäuren kodierend eine  $\beta$ -Hydroxylase,
  - c) Nukleinsäuren kodierend eine HMG-CoA-Reduktase,
  - 20 d) Nukleinsäuren kodierend eine (E)-4-Hydroxy-3-Methyl-  
but-2-enyl-Diphosphat-Reduktase
  - e) Nukleinsäuren kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-  
Synthase,
  - f) Nukleinsäuren kodierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-  
25 Reduktoisomerase,
  - g) Nukleinsäuren kodierend eine Isopentenyl-Diphosphat-  
 $\Delta$ -Isomerase,
  - h) Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Diphosphat-Synthase,
  - i) Nukleinsäuren kodierend eine Farnesyl-Diphosphat-Syn-  
30 thase,
  - j) Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Geranyl-Diphosphat-  
Synthase,
  - k) Nukleinsäuren kodierend eine Phytoen-Synthase,
  - l) Nukleinsäuren kodierend eine Phytoen-Desaturase,
  - 35 m) Nukleinsäuren kodierend eine Zeta-Carotin-Desaturase,
  - n) Nukleinsäuren kodierend ein crtISO Protein,
  - o) Nukleinsäuren kodierend ein FtsZ Protein,
  - p) Nukleinsäuren kodierend ein MinD Protein,
  - q) doppelsträngige endogenen  $\beta$ -Hydroxylase Ribonukleinsäure-  
40 sequenz und/oder endogene  $\beta$ -Hydroxylase antisense-Ribo-  
nukleinsäuresequenzen und
  - r) doppelsträngige  $\epsilon$ -Cyclase- Ribonukleinsäuresequenz  
und/oder  $\epsilon$ -Cyclase antisense-Ribonukleinsäuresequenz,  
wobei die Nukleinsäuren mit einem oder mehreren Regulations-  
45 signalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription  
und Translation in Pflanzen gewährleisten.

## 76. Doppelsträngiges RNA-Molekül umfassend

- 5 a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA- $\epsilon$ -Cyclase Transkriptes, und
- 10 b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-sense-Strang unter a) im wesentlichen komplementär ist.

## 77. Doppelsträngiges RNA-Molekül umfassend

- 15 a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes des Promotorbereichs eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens, und
- 20 b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen komplementär ist.

78. Doppelsträngiges RNA-Molekül nach Anspruch 76, wobei die aus dem  $\epsilon$ -Cyclase-Transkript ableitbare cDNA-Sequenz durch SEQ ID NO: 38 beschrieben ist.

25 79. Doppelsträngiges RNA-Molekül nach Anspruch 77, wobei die Nukleinsäuresequenz des Promotorbereichs des  $\epsilon$ -Cyclase-Gens durch SEQ ID NO: 47 beschrieben ist.

30 80. Doppelsträngiges RNA-Molekül nach einem der Ansprüche 76 bis 79, wobei "sense"-RNA-Strang und "antisense"-RNA-Strang kovalent in Form eines invertierten Repeats miteinander verbunden sind.

## 81. Doppelsträngiges RNA-Molekül umfassend

- 35 a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes der endogenen  $\beta$ -Hydroxylase, und
- 40 b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-sense-Strang unter a) im wesentlichen komplementär ist.

82. Doppelsträngiges RNA-Molekül umfassend

- 5 a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes des Promotorbereichs des endogenen  $\beta$ -Hydroxylase -Gens, und
- 10 b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen komplementär ist.

83. Doppelsträngiges RNA-Molekül nach Anspruch 83, wobei die aus dem endogenen  $\beta$ -Hydroxylase-Transkript ableitbare cDNA-Sequenz durch SEQ ID NO: 103 beschrieben ist.

15 84. Transgene Expressionskassette enthaltend in funktioneller Verknüpfung mit einem in pflanzlichen Organismen funktionellen Promotor eine Nukleinsäuresequenz transkribierend ein doppelsträngiges RNA-Molekül gemäß einem der Ansprüche 76 bis 83.

20 85. Transgene Expressionskassette nach Anspruch 84, wobei der Promotor ein blütenspezifischer Promotor ist.

25 86. Genetisch veränderte Pflanze, wobei die genetische Veränderung die Aktivität einer Ketolase in Blütenblättern,

A für den Fall, dass die Wildtyppflanze bereits eine Ketolase-Aktivität in Blütenblättern aufweist, gegenüber dem Wildtyp erhöht und

30 B für den Fall, dass die Wildtyppflanze keine Ketolase-Aktivität in Blütenblättern aufweist, gegenüber dem Wildtyp verursacht.

35 87. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 86, dadurch gekennzeichnet, dass die Erhöhung oder Verursachung der Ketolase-Aktivität durch eine Erhöhung oder Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Ketolase gegenüber dem Wildtyp bewirkt wird.

40 88. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 87, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung oder Verursachung der Genexpression Nukleinsäuren in die Pflanze einbringt, die Ketolasen kodieren.

45

89. Genetisch veränderte Pflanze, die in den Blütenblättern Chromoplasten aufweist, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderte Pflanze mindestens eine transgene Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase enthält.
- 5
90. Genetisch veränderte Pflanze nach einem der Ansprüche 86 bis 89, dadurch gekennzeichnet, dass die genetische Veränderung zusätzlich mindestens eine der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Hydroxylase-Aktivität und  $\beta$ -Cyclase-Aktivität
- 10 gegenüber einer Wildtyppflanze erhöht.
91. Genetisch veränderte Pflanze nach einem der Ansprüche 86 bis 90, dadurch gekennzeichnet, dass die genetische Veränderung zusätzlich die  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität gegenüber einer Wildtyp-
- 15 pflanze reduziert.
92. Genetisch veränderte Pflanze nach einem der Ansprüche 86 bis 91, dadurch gekennzeichnet, dass die genetische Veränderung zusätzlich mindestens eine der Aktivitäten, ausgewählt aus
- 20 der Gruppe HMG-CoA-Reduktase-Aktivität, (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat-Reduktase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase-Aktivität, 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Reduktoisomerase-Aktivität, Isopentenyl-Diphosphat- $\Delta$ -Isomerase-Aktivität, Geranyl-Diphosphat-Synthase-
- 25 Aktivität, Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Geranylgeranyl-Diphosphat-Synthase-Aktivität, Phytoen-Synthase-Aktivität, Phytoen-Desaturase-Aktivität, Zeta-Carotin-Desaturase-Aktivität, crtISO-Aktivität, FtsZ-Aktivität und MinD-Aktivität gegenüber einer Wildtyppflanze erhöht.
- 30
93. Genetisch veränderte Pflanze nach einem der Ansprüche 86 bis 92, dadurch gekennzeichnet, dass die genetische Veränderung zusätzlich die endogene  $\beta$ -Hydroxylase Aktivität gegenüber
- 35 einer Wildtyppflanze reduziert.
94. Genetisch veränderte Pflanze nach einem der Ansprüche 86 bis 93, dadurch gekennzeichnet, dass die Pflanze ausgewählt ist aus den Pflanzenfamilien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae,
- 40 Vitaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Illiaceae oder Lamiaceae.
- 45

205

95. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 94, ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzengattungen Marigold, Tagetes erecta, Tagetes patula, Lycopersicon, Rosa, Calendula, Physalis, Medicago, Helianthus, Chrysanthemum, Aster, Tulipa, Narcissus, Petunia, Geranium, oder Tropaeolum oder Adonis.
96. Genetisch veränderte Pflanze nach einem der Ansprüche 86 bis 95, dadurch gekennzeichnet, dass die Ketolase in Blütenblättern exprimiert wird.
97. Genetisch veränderte Pflanze nach einem der Ansprüche 86 bis 96, dadurch gekennzeichnet, dass die Expressionsrate einer Ketolase in Blütenblättern am höchsten ist.
98. Verwendung der genetisch veränderten Pflanzen nach einem der Ansprüche 86 bis 97 als Zierpflanzen oder als Futter- und Nahrungsmittel.
99. Verwendung der Blütenblätter der genetisch veränderten Pflanzen nach einem der Ansprüche 86 bis 97 zur Herstellung von Ketocarotinoid-haltigen Extrakten oder zur Herstellung von Futter- und Nahrungsergänzungsmittel.
100. Verfahren zur Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen gemäß Anspruch 97, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend funktionell verknüpft einen blütenspezifischen Promotor und Nukleinsäuren kodierend eine Ketolase in das Genom der Ausgangspflanze einführt.

# Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden in Blütenblättern von Pflanzen

## 5 Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern aufweisen, die genetisch veränderten Pflanzen, sowie deren Verwendung als Nahrungs- und Futtermittel und zur Herstellung von Ketocarotinoidextrakten.

15

20

25

30

35

40

45



Abbildung 1: Biosyntheschema von Carotinoiden in Tomatenblüten

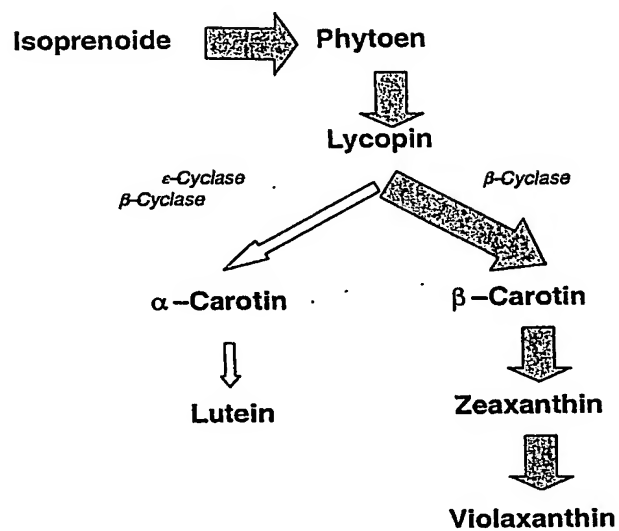
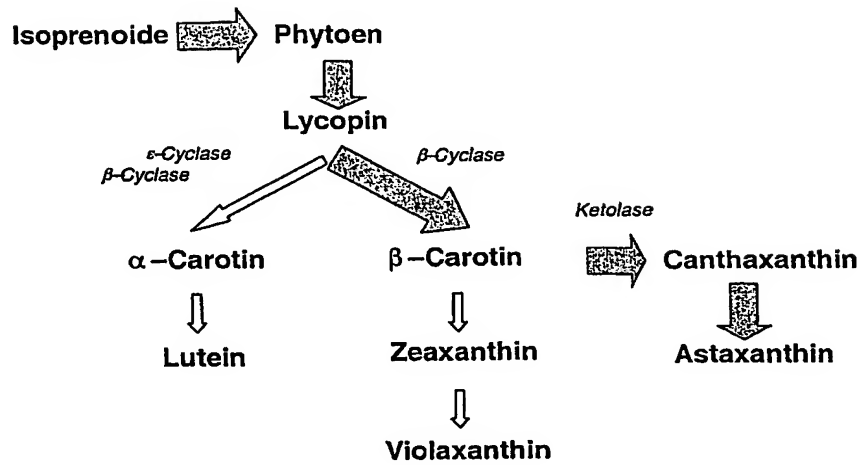


Abbildung 2: Biosyntheseschema von Astaxanthin in genetisch veraenderten Blüten



## Abbildung 3: Nukleotidsequenzvergleich

```

KETO2.seq  ATCCAGCTAGCAGCGACAGTAATGTTGGAGCCAGCTTACCGGAAGCCCTGAGGCACTCAAGGAGAAGGAGAAGGAGGTTGCAGCCAGCTCTGAGGTGTTGC 100
X86782.seq  ATCCAGCTAGCAGCGACAGTAATGTTGGAGCCAGCTTACCGGAAGCCCTGAGGCACTCAAGGAGAAGGAGAAGGAGGTTGCAGCCAGCTCTGAGGTGTTGC 100

KETO2.seq  GTACATGGGGACCCAGTACTGGCTTGGTCAGAGAGTCAAGAGGCGCGCGCGCGGACTGAAGAATGGCTACAAGCCACACCTTCCGACACAAAGGG 200
X86782.seq  GTACATGGGGACCCAGTACTGGCTTGGTCAGAGAGTCAAGAGGCGCGCGCGGACTGAAGAATGGCTACAAGCCACACCTTCCGACACAAAGGG 200

KETO2.seq  CATCACAATCGCGCTAGCTGTATGGGCTCTGGGCGGAGTGTCTCCACCGCATTTTTCAAATCAAGCTTCCGAGCTCTTGGAGCAGCTGCACTGG 300
X86782.seq  CATCACAATCGCGCTAGCTGTATGGGCTCTGGGCGGAGTGTCTCCACCGCATTTTTCAAATCAAGCTTCCGAGCTCTTGGAGCAGCTGCACTGG 300

KETO2.seq  CTGCGCGGTGTGAGATGCCACAGCTCAGCTGGTTAGCGGCAGGAGCAGGCTCTGACATGGTGGTAGTATCTTTGTCTGGAGTTCCTGTACACAGGCC 400
X86782.seq  CTGCGCGGTGTGAGATGCCACAGCTCAGCTGGTTAGCGGCAGGAGCAGGCTCTGACATGGTGGTAGTATCTTTGTCTGGAGTTCCTGTACACAGGCC 400

KETO2.seq  TTTTATCAGCAGCATGATGCTATGCAATGCCAGCATGGCATGAGAAACAGGAGCTTAATGACTTCTTGGCAGAGTATGCATCTCTTGTAGCGCTG 500
X86782.seq  TTTTATCAGCAGCATGATGCTATGCAATGCCAGCATGGCATGAGAAACAGGAGCTTAATGACTTCTTGGCAGAGTATGCATCTCTTGTAGCGCTG 500

KETO2.seq  GTTTGATTACAACATGCTCCACCGCAAGCATTTGGAGCAGCAGCAGCAGCTGGGAGGTGGCAAGGAGGAGCTGACCTCCACAGGGGAAAGCTGGCAT 600
X86782.seq  GTTTGATTACAACATGCTCCACCGCAAGCATTTGGAGCAGCAGCAGCAGCTGGGAGGTGGCAAGGAGGAGCTGACCTCCACAGGGGAAAGCTGGCAT 600

KETO2.seq  GTGCGCTGGTTTGGCAGCTTCATGTCCAGCTACATGTGGATGTGGCAGTTTGGCGGCTCCCATGGTGGAGGTTGGTATCCAGCTGCTGGGTGGGCAA 700
X86782.seq  GTGCGCTGGTTTGGCAGCTTCATGTCCAGCTACATGTGGATGTGGCAGTTTGGCGGCTCCCATGGTGGAGGTTGGTATCCAGCTGCTGGGTGGGCAA 700

KETO2.seq  TGGCGAAGCTGCTGGTGTTCATGGCGCGCGCGCGCATCTGTGGCGCTTGGCTTGTCTACTTTGGCAGTACATGGCGCACAAGGCTGAGGCTGGGCG 800
X86782.seq  TGGCGAAGCTGCTGGTGTTCATGGCGCGCGCGCGCATCTGTGGCGCTTGGCTTGTCTACTTTGGCAGTACATGGCGCACAAGGCTGAGGCTGGGCG 800

KETO2.seq  CCGGTACGGCTCTTCAGCAGCGGTATGAACCTGGTGAAGTGGGCACTAGCCAGCGGTGGAGCTGGTCAAGCTTCTGAGCTGCTACCACTTGGAGCTG 900
X86782.seq  CCGGTACGGCTCTTCAGCAGCGGTATGAACCTGGTGAAGTGGGCACTAGCCAGCGGTGGAGCTGGTCAAGCTTCTGAGCTGCTACCACTTGGAGCTG 900

KETO2.seq  CACTGGGAGCAGCAGCGCTGGCGCTTTGGCGGCTGGTGGAGCTGGGCACTGGCGCGGCTGTCTGGCGAGGTCGTGGTTCTGCTAG 990
X86782.seq  CACTGGGAGCAGCAGCGCTGGCGCTTTGGCGGCTGGTGGAGCTGGGCACTGGCGCGGCTGTCTGGCGAGGTCGTGGTTCTGCTAG 990

```

## Abbildung 4: Proteinsequenzvergleich

KETO2.pro	MQLAATVMLEQLTGSAEALKEKEKEVAGSSDVLRTWATQYSLPSEESDAA	50
X86782.pro	MQLAATVMLEQLTGSAEALKEKEKEVAGSSDVLRTWATQYSLPSEESDAA	50
KETO2.pro	RPGLKNAYKPPPSDTKGITMALAVIGSWAAVFLHAI FQIKLPTS LDQLHW	100
X86782.pro	RPGLKNAYKPPPSDTKGITMALRVIGSWAAVFLHAI FQIKLPTS LDQLHW	100
KETO2.pro	LPVSDATAQLVSGSSSLLHIVVVFFVLEFLYTGLFITTHDAMHG TI AMRN	150
X86782.pro	LPVSDATAQLVSGTSSLLDIVVVFFVLEFLYTGLFITTHDAMHG TI AMRN	150
KETO2.pro	RQLNDFLGRVCISLYAWFDYNMLHRKHWEHHNHTGEV GKDPDFHRGNP GI	200
X86782.pro	RQLNDFLGRVCISLYAWFDYNMLHRKHWEHHNHTGEV GKDPDFHRGNP GI	200
KETO2.pro	VPWFASFMS SYMSMWQFARLA WWTVVMQLLGAPMANLLVFMAA API LSAF	250
X86782.pro	VPWFASFMS SYMSMWQFARLA WWTVVMQLLGAPMANLLVFMAA API LSAF	250
KETO2.pro	RLFYFGTYMPHKPEPGAASGSSPAVMNWWKSRTSQASDLVSFLT CYHFDL	300
X86782.pro	RLFYFGTYMPHKPEPGAASGSSPAVMNWWKSRTSQASDLVSFLT CYHFDL	300
KETO2.pro	HWEHHRWPFAPWWELPNCRRLS GRGLVPA	329
X86782.pro	HWEHHRWPFAPWWELPNCRRLS GRGLVPA	329

Abbildung 5A: Konstrukt zur Überexpression der Ketolase ( $\beta$ -C-4-Oxygenase) Proteins aus *H. pluvialis* mit *rbcS* Transitpeptid aus Erbse unter Kontrolle des d35S-Promoters (Tomatentransformationskonstrukt)

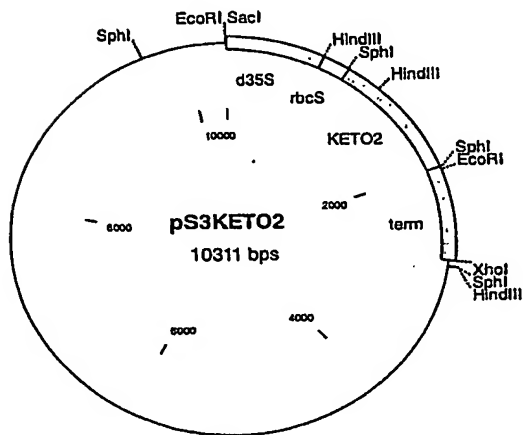


Abbildung 5B: Konstrukt zur Überexpression des Ketolase ( $\beta$ -C-4-Oxygenase) Proteins aus *H. pluvialis* mit rbcS Transitpeptid aus Erbse unter Kontrolle des d35S-Promoters (Tagetestransformationskonstrukt)

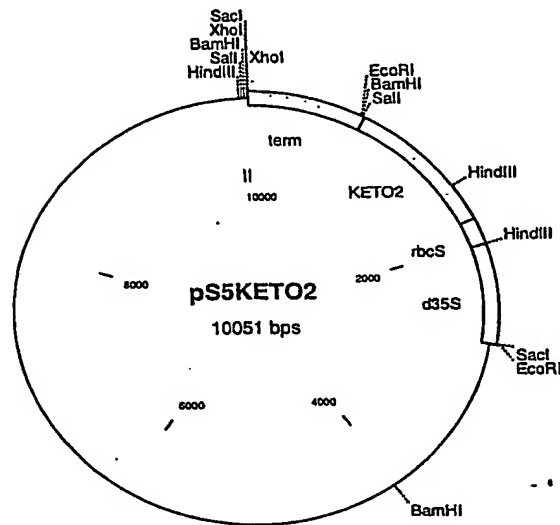
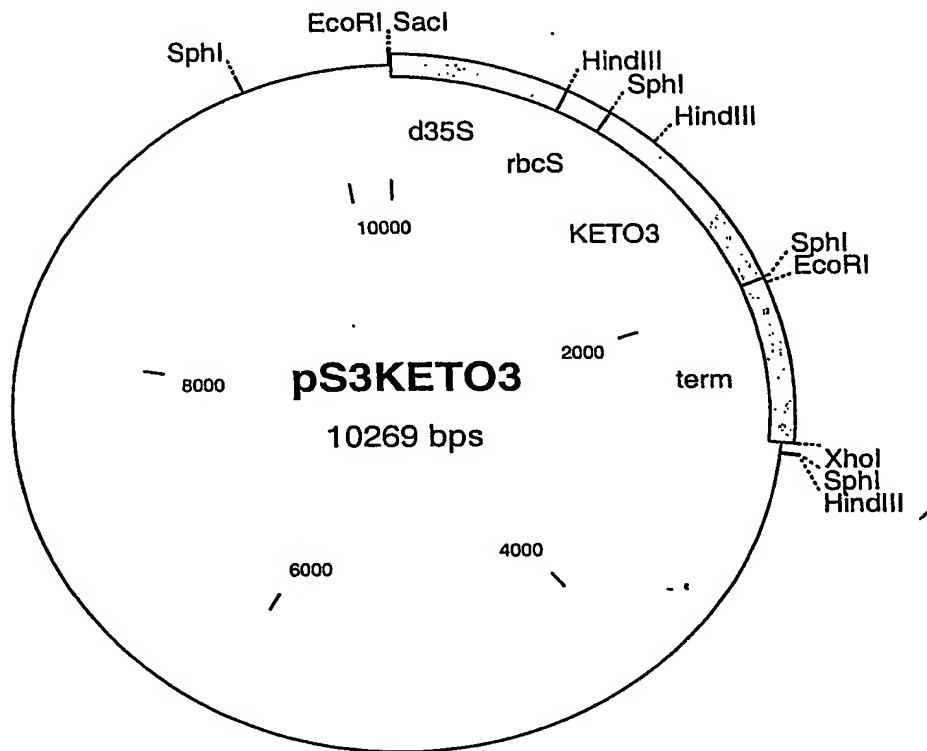
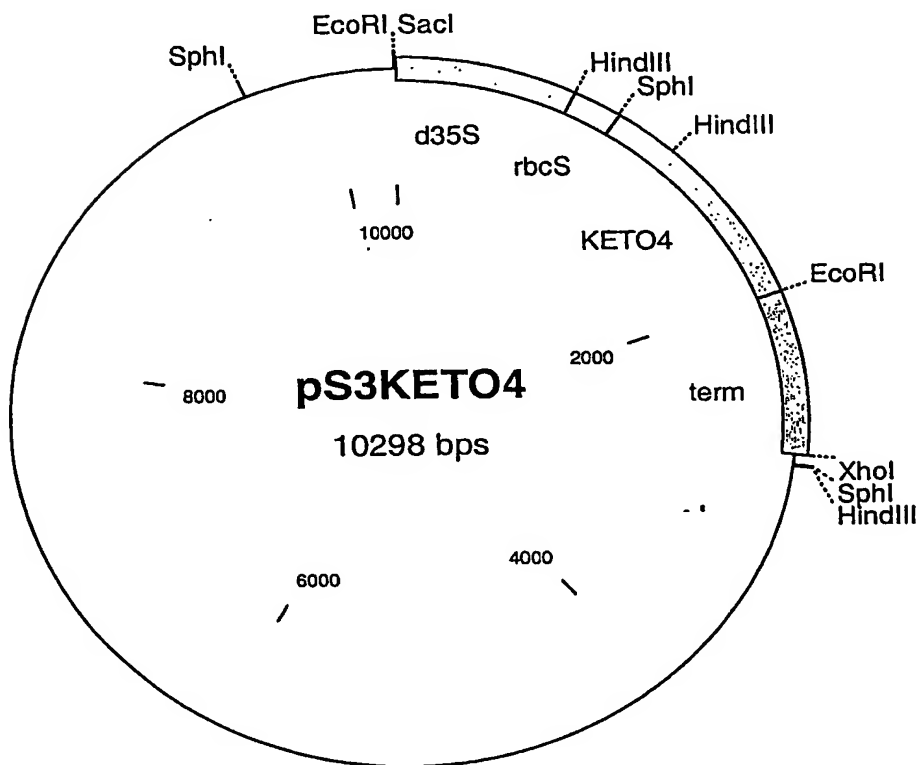


Abbildung 6: Konstrukt zur Überexpression des N-terminal verkürzten Ketolase ( $\beta$ -C-4-Oxygenase) Proteins aus *H. pluvialis* mit rbcS Transitpeptid aus Erbse unter Kontrolle des d35S-Promoters.



8/47

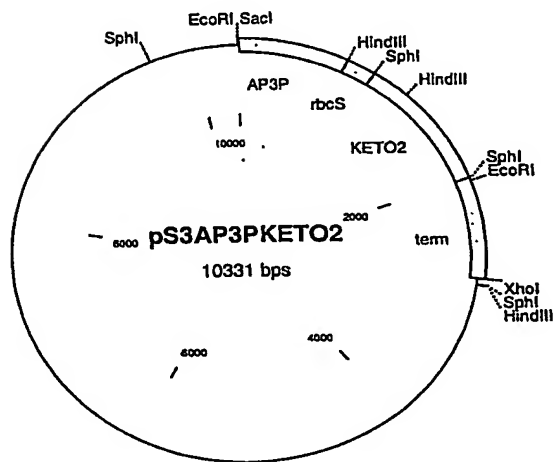
Abbildung 7: Konstrukt zur Überexpression des Ketolase ( $\beta$ -C-4-Oxy-  
genase) Protein aus *H. pluvialis* mit rbcS Transit-  
peptid aus Erbse und C-terminalem myc-Tag unter  
Kontrolle des d35S-Promoters.





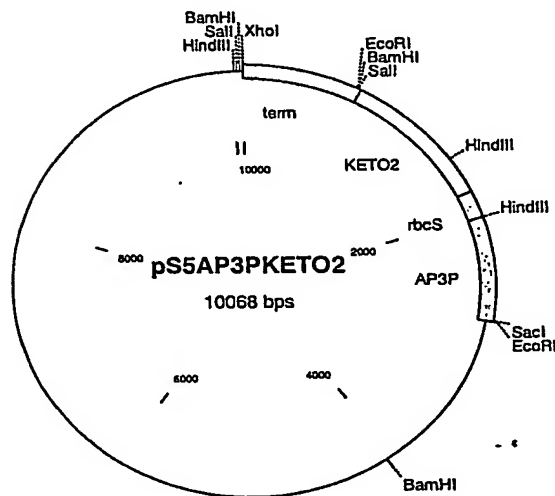
9/47

Abbildung 8A: Konstrukt pS3AP3PKETO2 zur Überexpression des Ketolase ( $\beta$ -C-4-Oxygenase) Proteins aus *H. pluvialis* mit *rbcS* Transitpeptid aus Erbse unter Kontrolle des AP3P-Promoters (Tomatentransformationskonstrukt).



10/47

Abbildung 8B: Konstrukt pS5AP3PKETO2 zur Überexpression der Ketolase ( $\beta$ -C-4-Oxygenase) Proteins aus *H. pluvialis* mit *rbcS* Transitpeptide aus Erbse unter Kontrolle des AP3P-Promoters (Tagetestransformationskonstrukt).



11/47

Abbildung 9: Konstrukt zur Überexpression des Ketolase ( $\beta$ -C-4-Oxy-  
genase) Protein aus *H. pluvialis* mit rbcS Transit-  
peptid aus Erbse und C-terminalem myc-Tag unter  
Kontrolle des AP3P-Promoters.

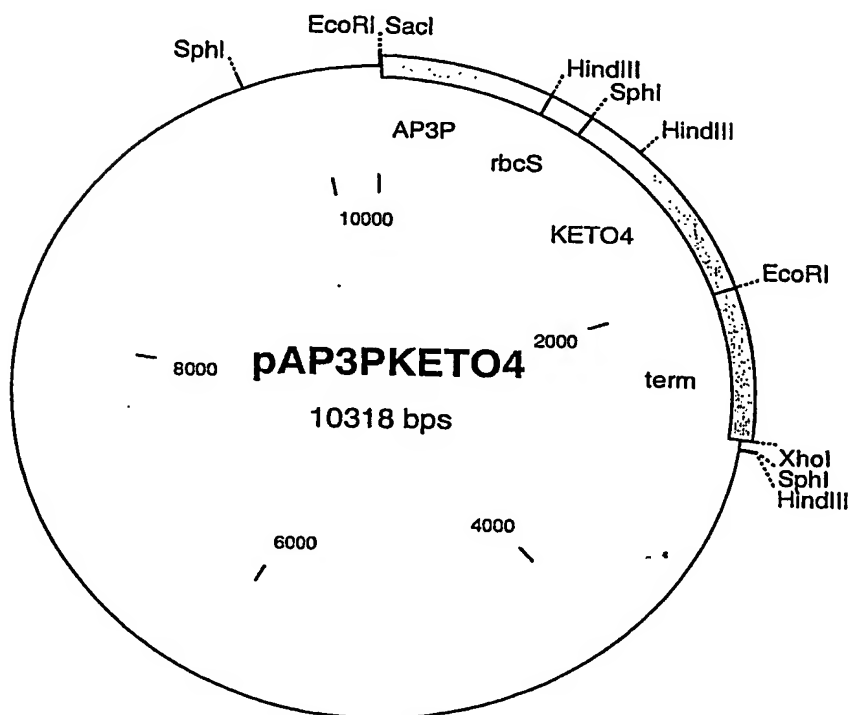
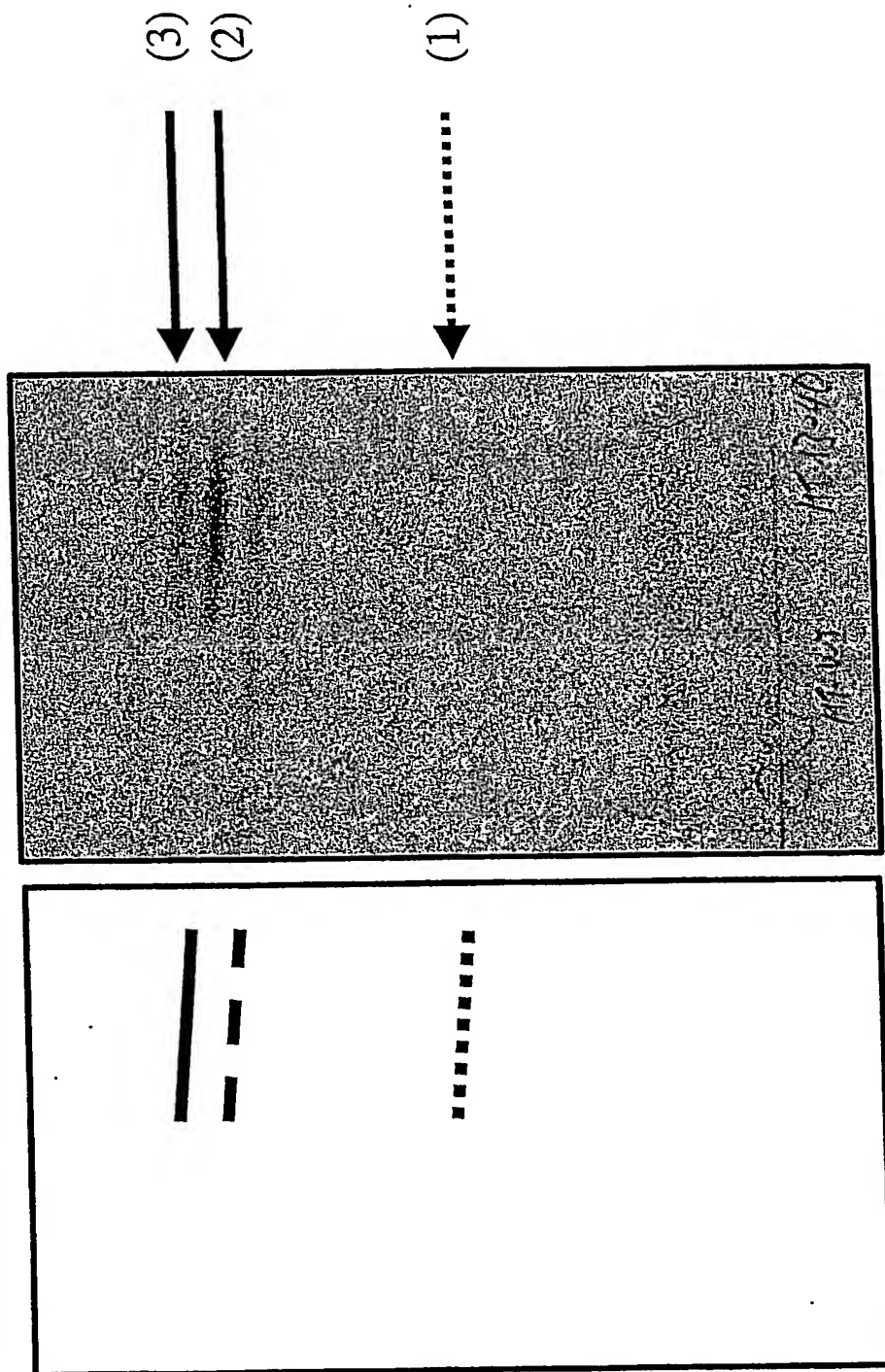


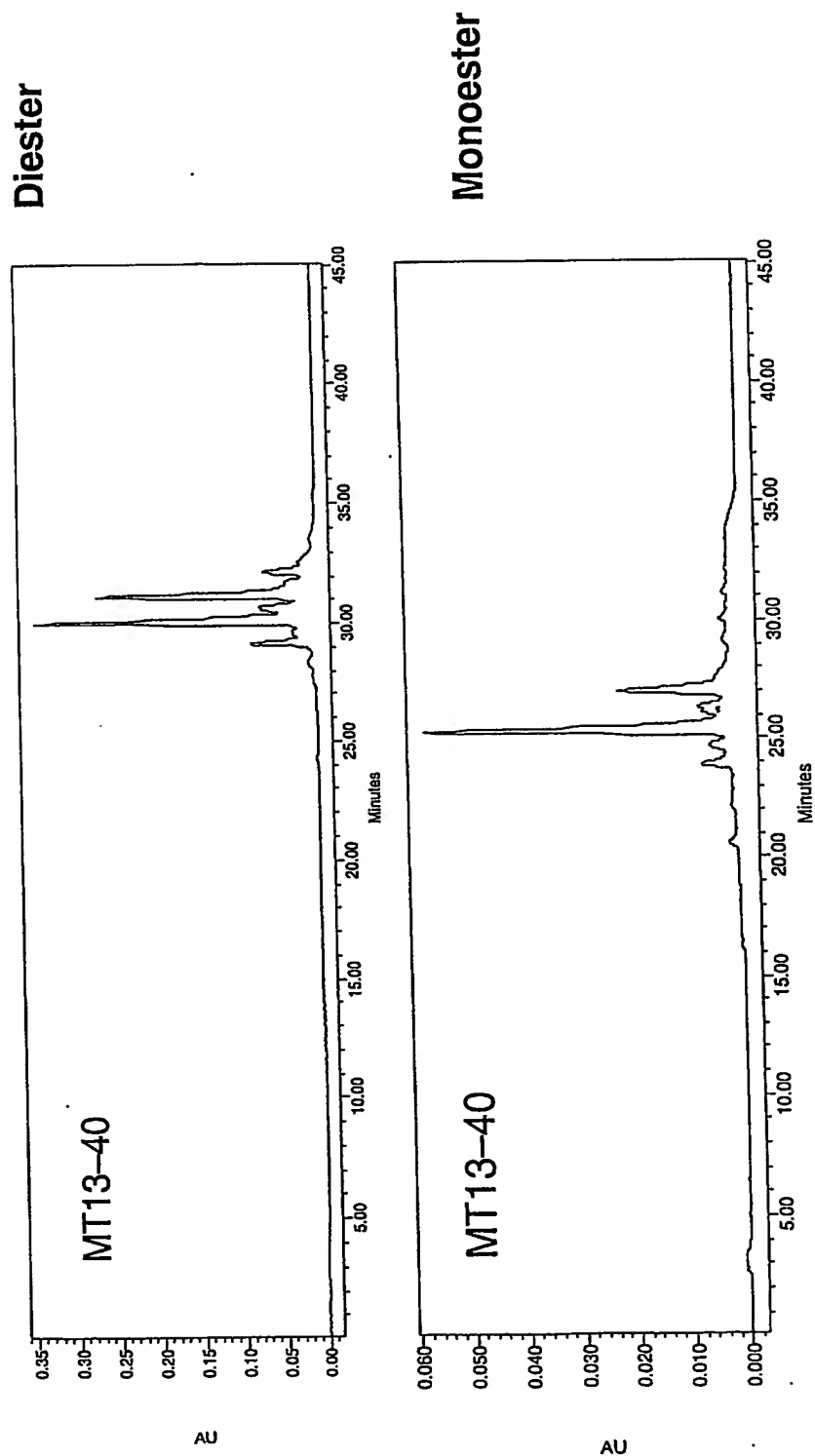
Abbildung 9a: Esterauftrennung mittels Dünnschichtchromatographie



Linksschematische Darstellung , rechts Foto der Dünnschichtplatte . (3) und (2) deuten auf Ketocarotinoid -Diester , (1) auf Ketocarotinoid -Monoester

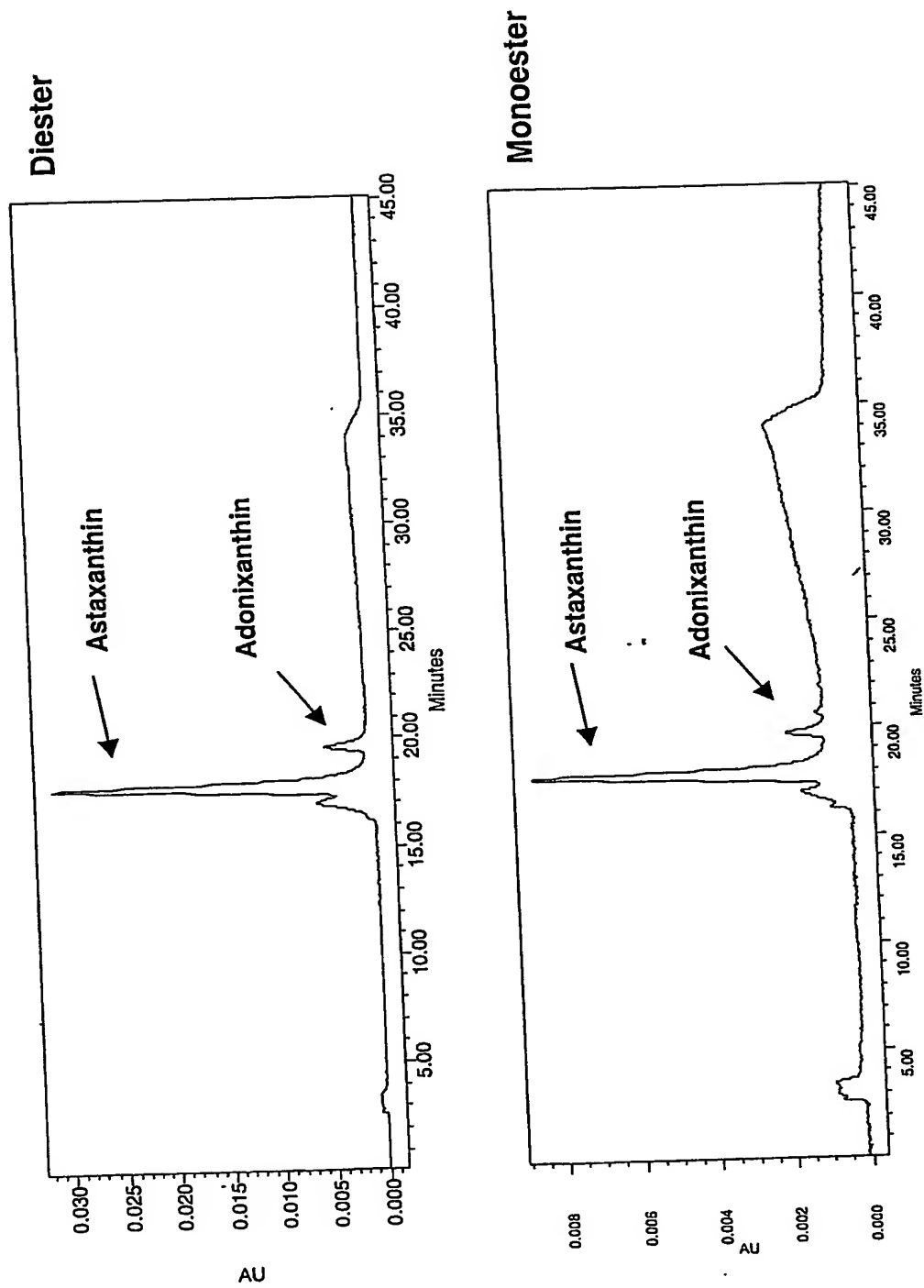
13/47

Fig. 10



14/47

Fig. 11



15/47

Abbildung 12: Klonierungskassette zur Herstellung von Inverted-Repeat-Expressionskassetten für die blüten-spezifische Expression von Epsilon-Cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta*

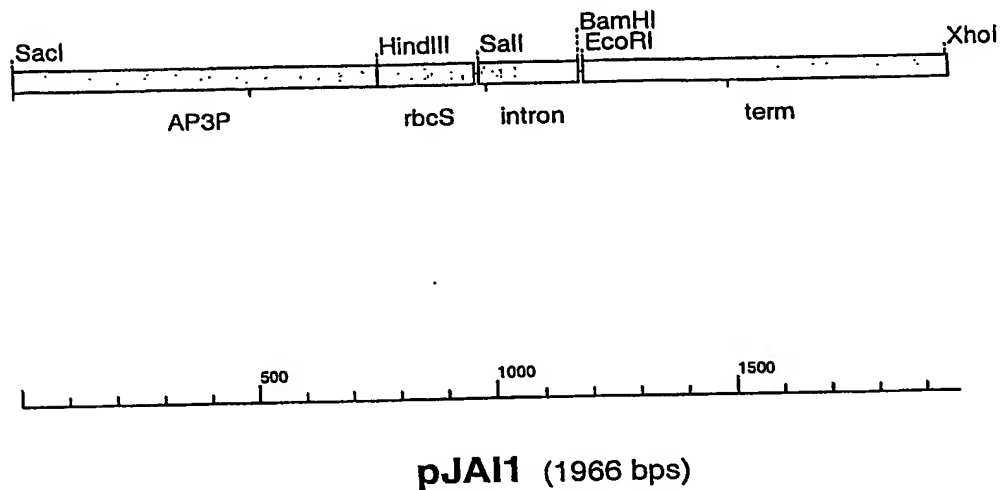


Abbildung 13: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend 5'terminale Fragmente der Epsilon-Cyclase cDNA (AF251016) unter Kontrolle des AP3P-Promoters

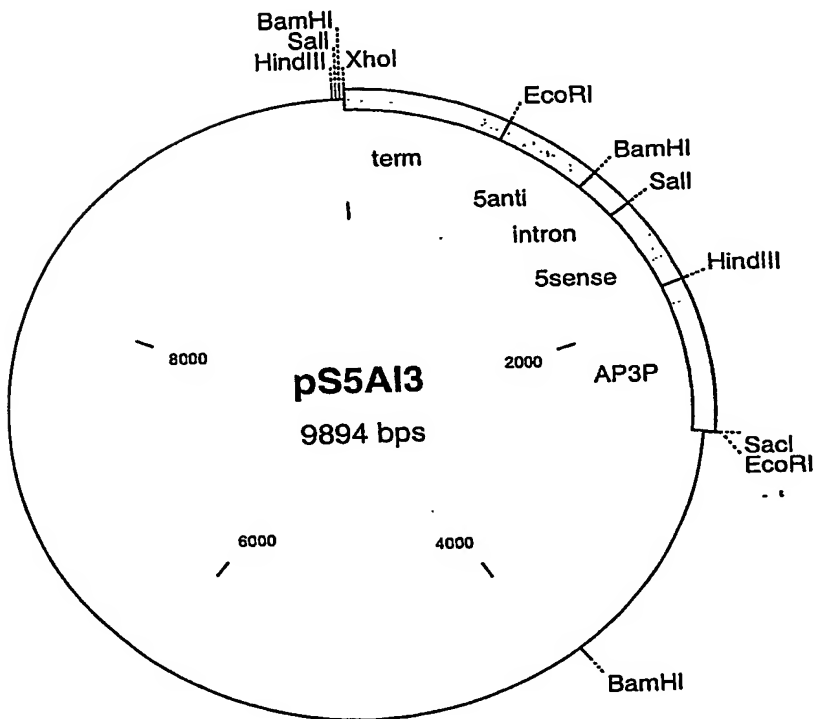




Abbildung 14: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend 5'terminalen Fragmente der Epsilon-Cyclase cDNA (AF251016) unter Kontrolle des CHRC-Promoters

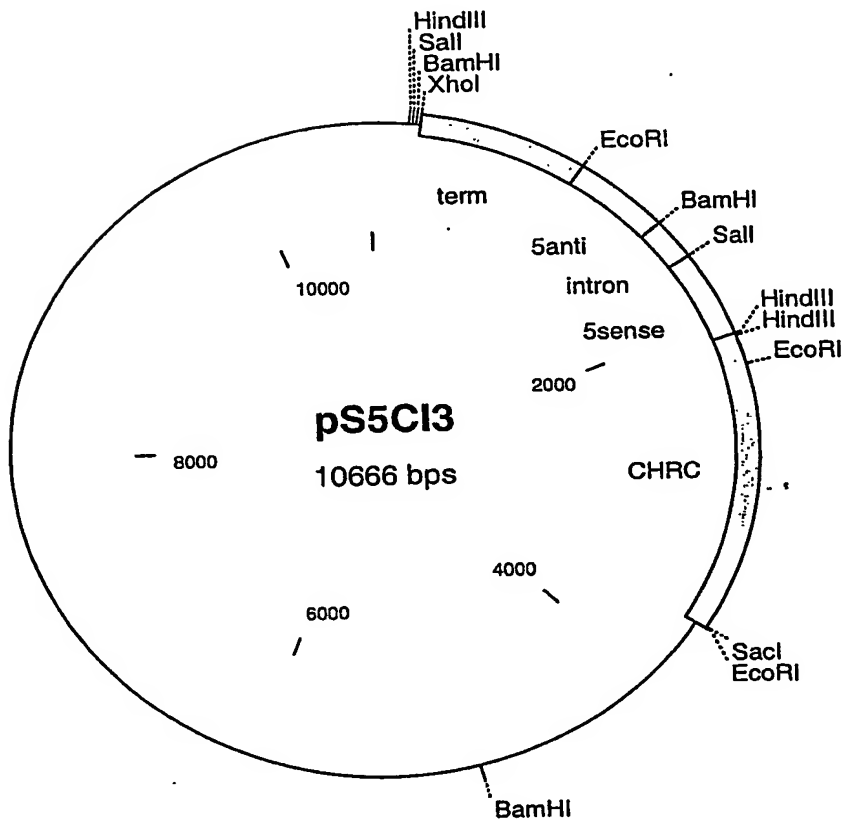


Abbildung 15: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend 3'terminale Fragmente der Epsilon-Cyclase cDNA (AF251016) unter Kontrolle des AP3P-Promoters

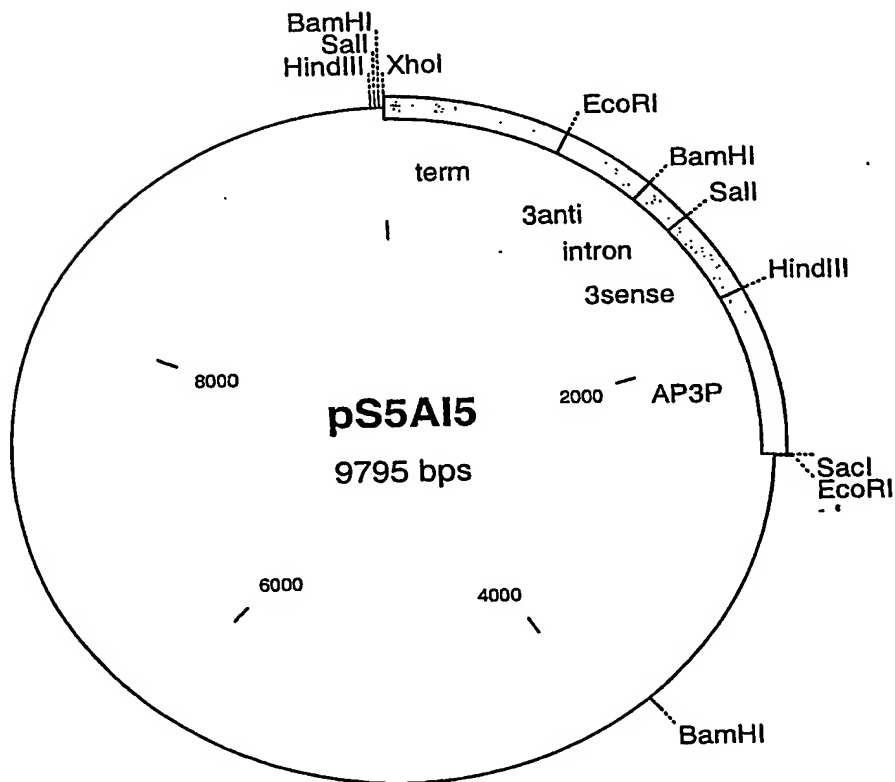


Abbildung 16: Inverse PCR-Amplifikat, das das 312 bp Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters enthält

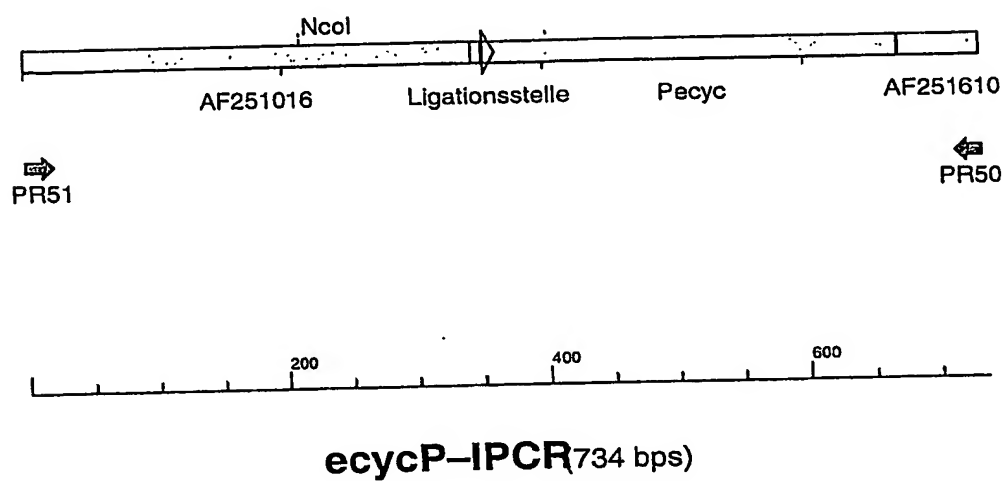


Abbildung 17: TAIL PCR-Amplifikat, das das 199 bp Fragment  
DES Epsilon-Cyclase Promoters enthält

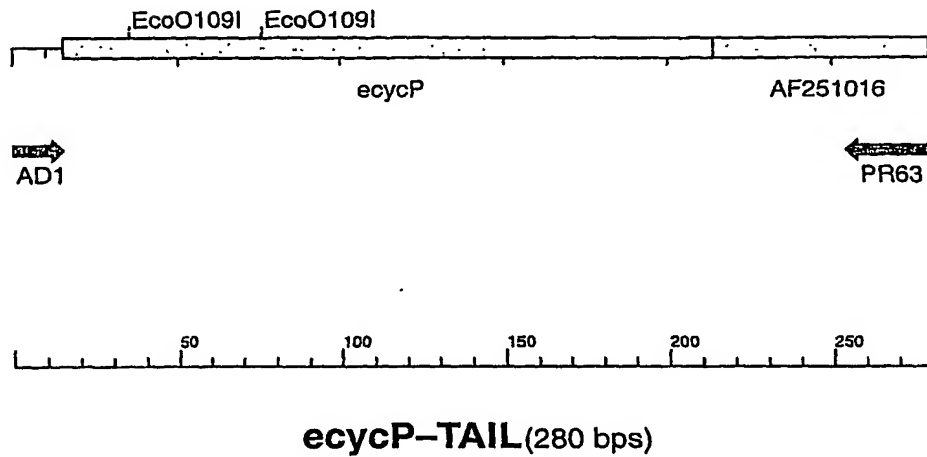


Abbildung 18: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend das 312 bp5 Promoterfragment der Epsilon-Cyclase unter Kontrolle des AP3P-Promoters

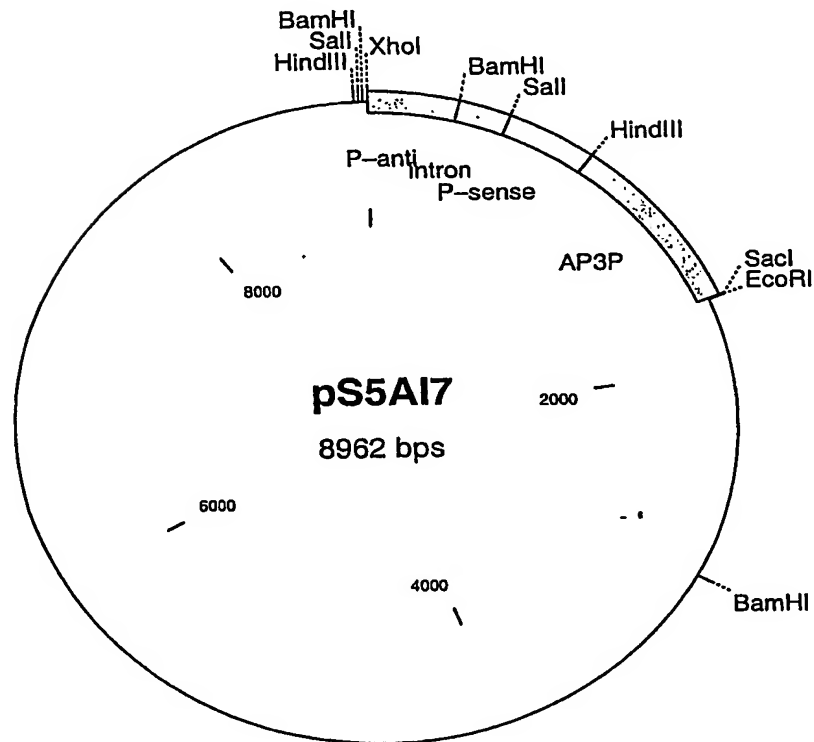


Abbildung 19: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase unter Kontrolle des CHRC-Promoters

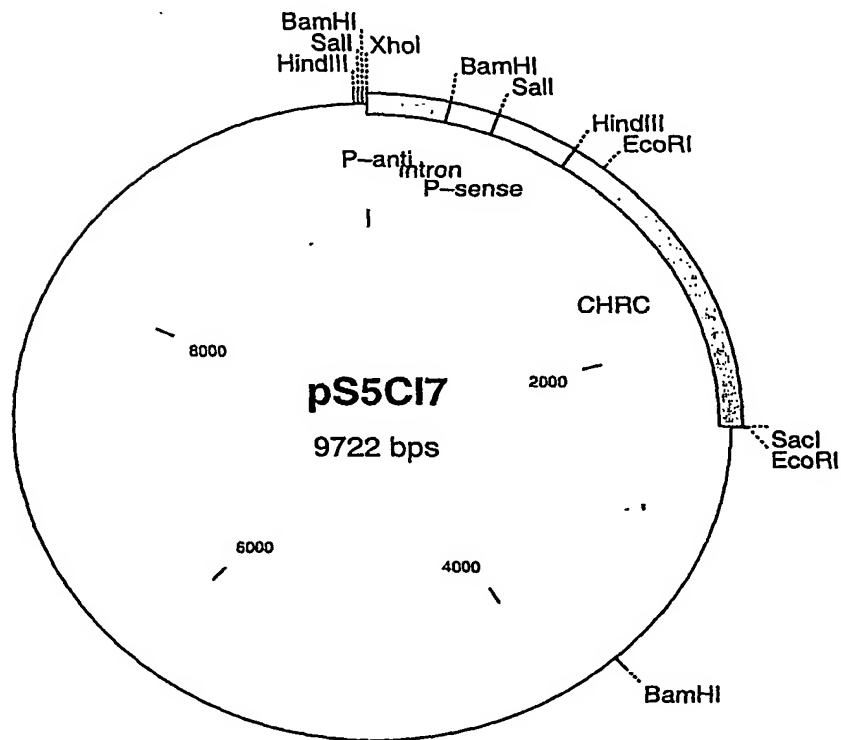


Abbildung 20: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend das 312 bp5 Promoterfragment der Epsilon-Cyclase unter Kontrolle sowohl des AP3P-Promoters als auch des CHRC-Promoters

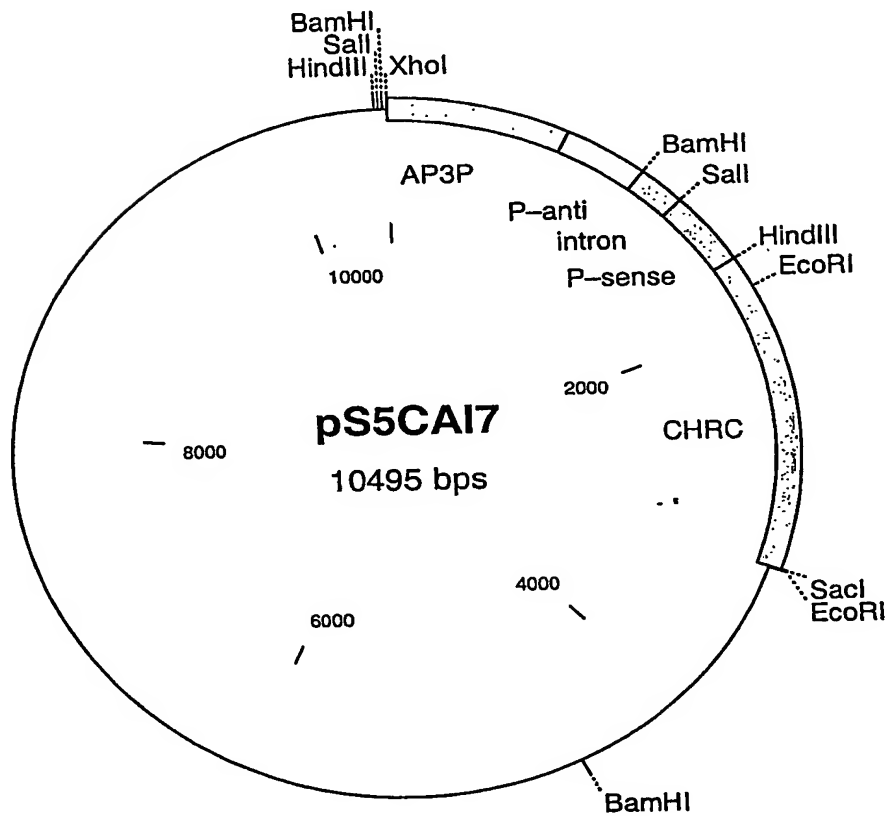


Abbildung 21: Konstrukt zur bluetenspezifischen Überexpression des Ketolase ( $\beta$ -C-4-Oxygenase) Proteins aus *H. pluvialis* ohne heterologes Transitpeptid.

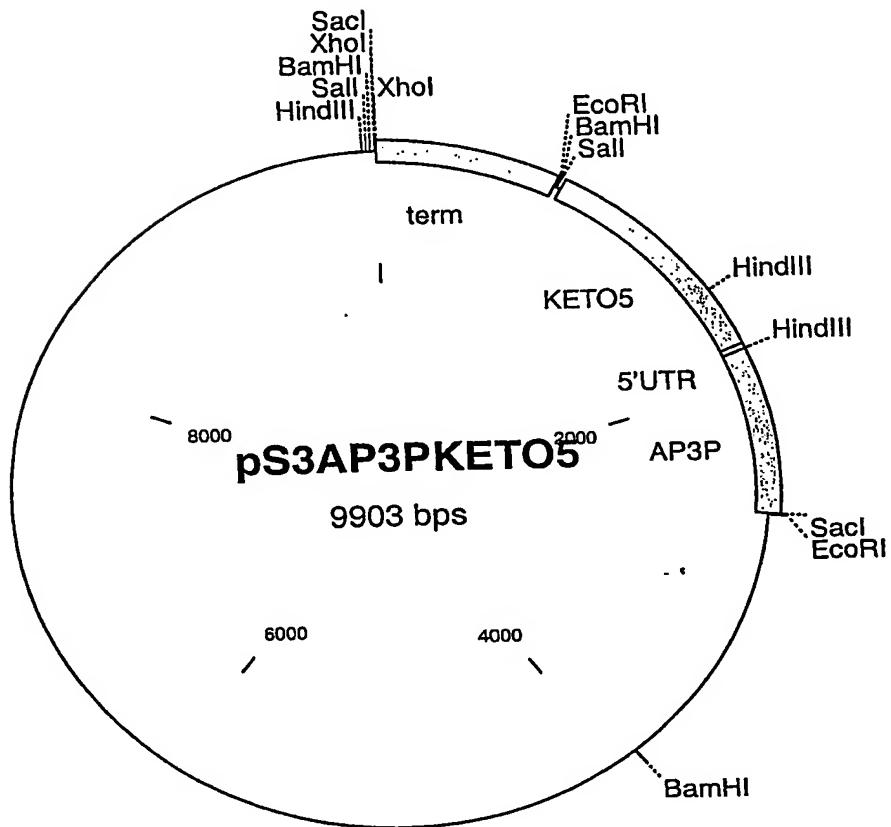




Abbildung 24: pSUN3 konstrukt zur Überexpression des  $\beta$ -C-4-Oxygenase Protein NP196 aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 mit rbcS Transitpeptid aus Erbse unter Kontrolle des EPSPS-Promoters

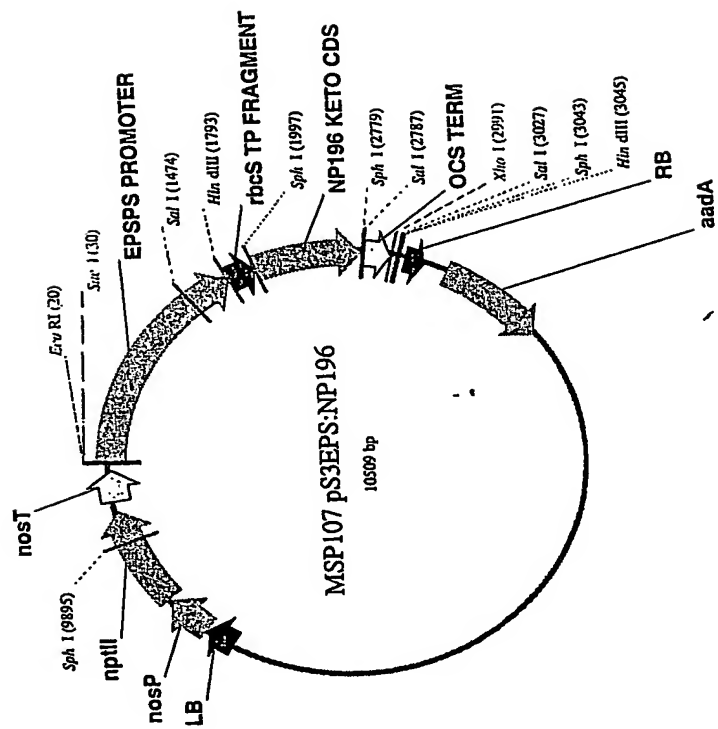


Abbildung 25: pSUN5 konstrukt zur Überexpression des  $\beta$ -C-4-Oxygenase Protein NP196 aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 mit rbcS Transsitpeptid aus Erbsen unter Kontrolle des EPSPS-Promoters

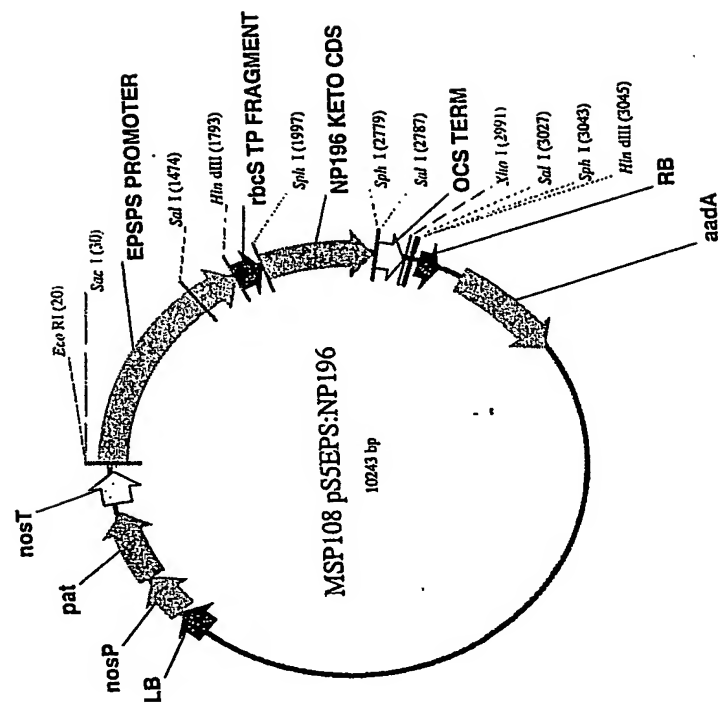


Abbildung 28: pSUN3 konstrukt zur Überexpression des  $\beta$ -C-4-Oxygenase Protein NP195 aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 mit rbcS Transitpeptid aus Erbse unter Kontrolle des EPSPS-Promoters

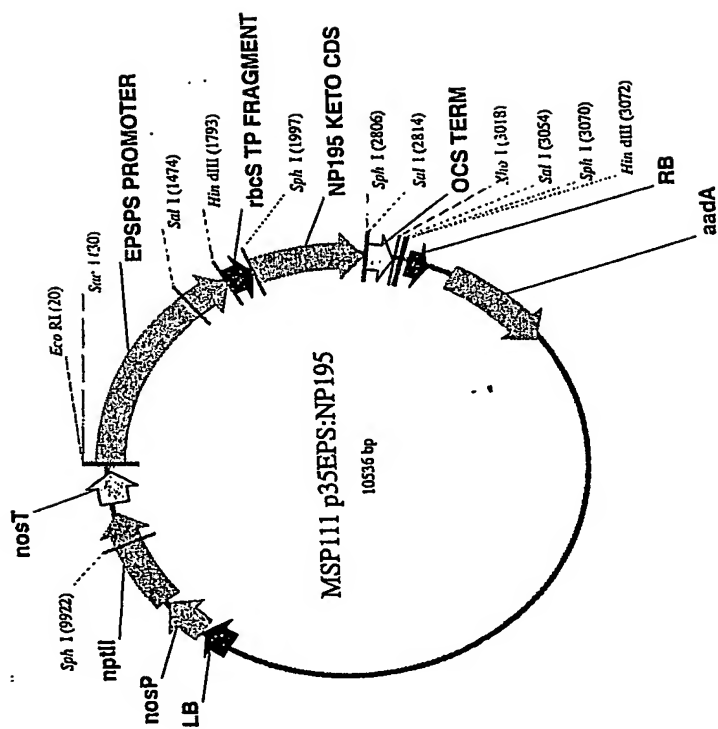


Abbildung 29: pSUN5 konstrukt zur Überexpression des  $\beta$ -C-4-Oxygenase Protein NP195 aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 mit rbcS Transsitpeptid aus Erbse unter Kontrolle des EPSPS-Promoters

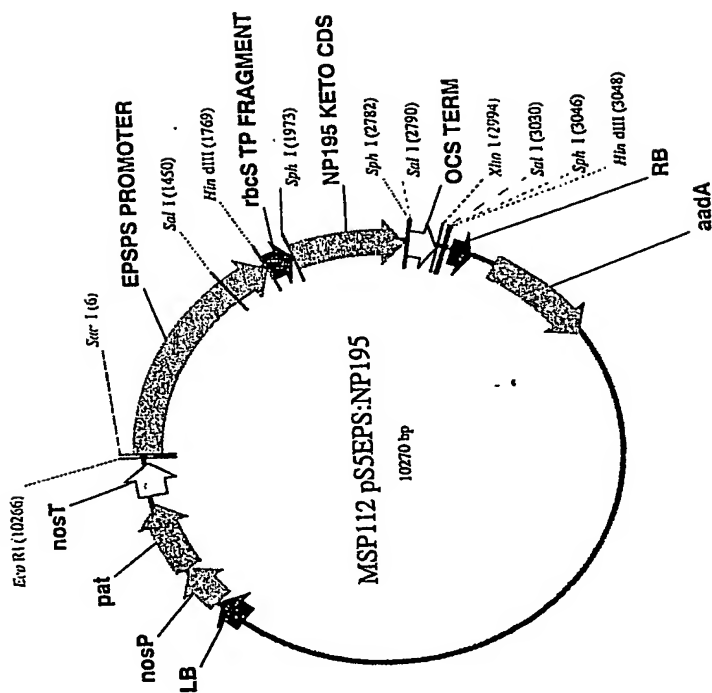


Abbildung 32: pSUN3 konstrukt zur Überexpression des  $\beta$ -C-4-Oxygenase Protein aus *Nodularia spumignea* NSOR10 mit rbcS Transitpeptid aus Erbse unter Kontrolle des EPSPS-Promoters

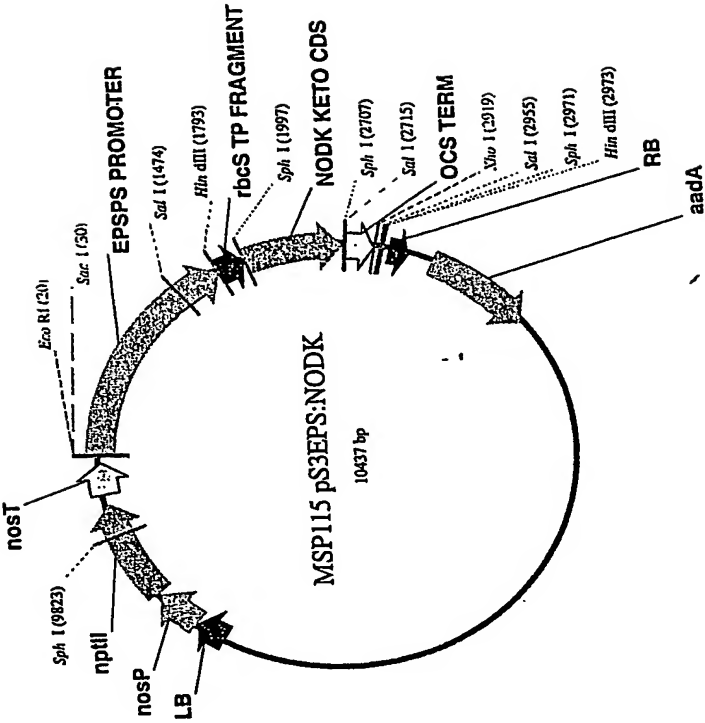


Abbildung 33: pSUN5 konstrukt zur Überexpression des  $\beta$ -C-4-Oxygenase Protein aus *Nodularia spumignea* NSOR10 mit rbcS Transitpeptid aus Erbse unter Kontrolle des EPSPS-Promoters

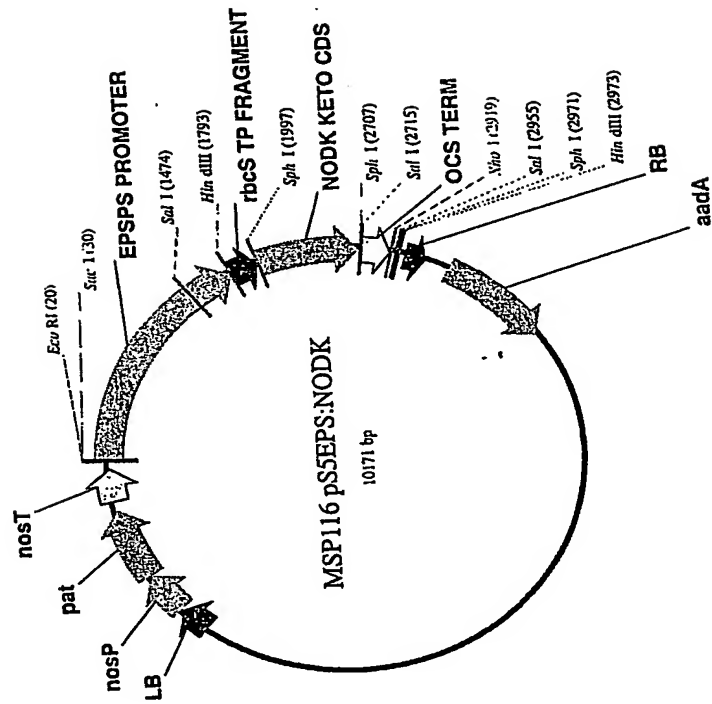


Abbildung 34: pSUN5 Konstrukt zur Überexpression des  $\beta$ -C-4-Oxygenase Proteins aus *Nodularia spumignea* NSOR10 sowie Runterregulierung der endogenen Tagetes Epsilon-Cyclase in *Tagetes erecta*.

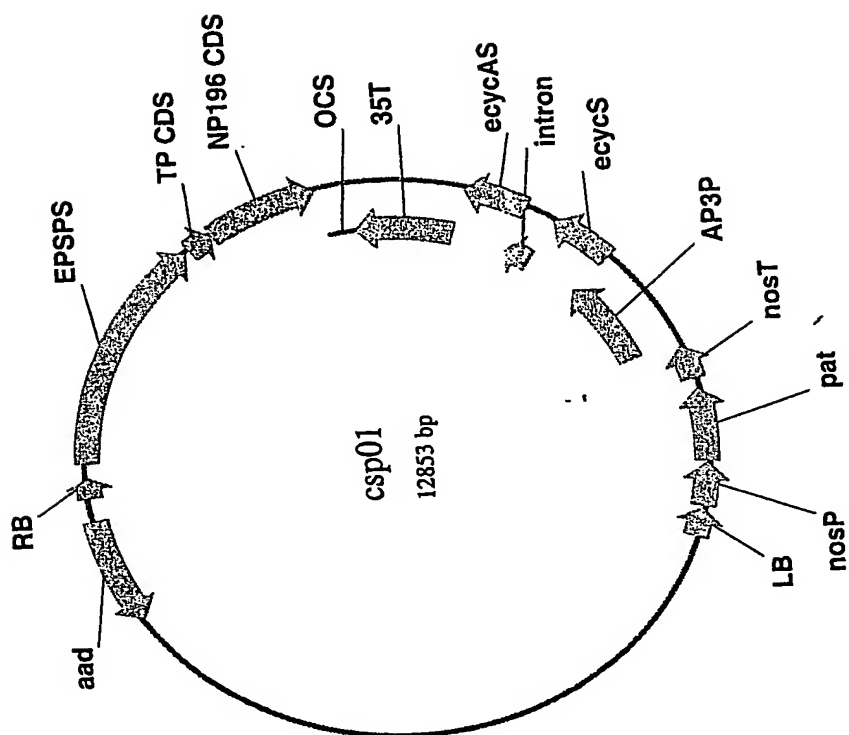


Abbildung 35: Expressionskassette zur Ueberexpression der b-Hydroxylase aus Tomate  
unter Kontrolle des EPSPS-Promoters

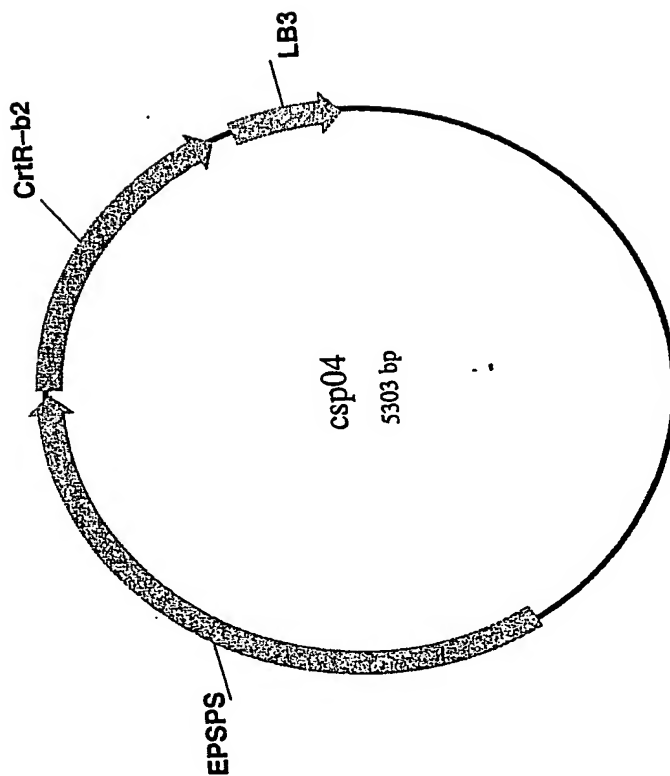




Abbildung 36: Expressionskassette zur Runterregulierung der endogenen b-Hydroxylase aus Tagetes unter Kontrolle des EPSPS-Promoters

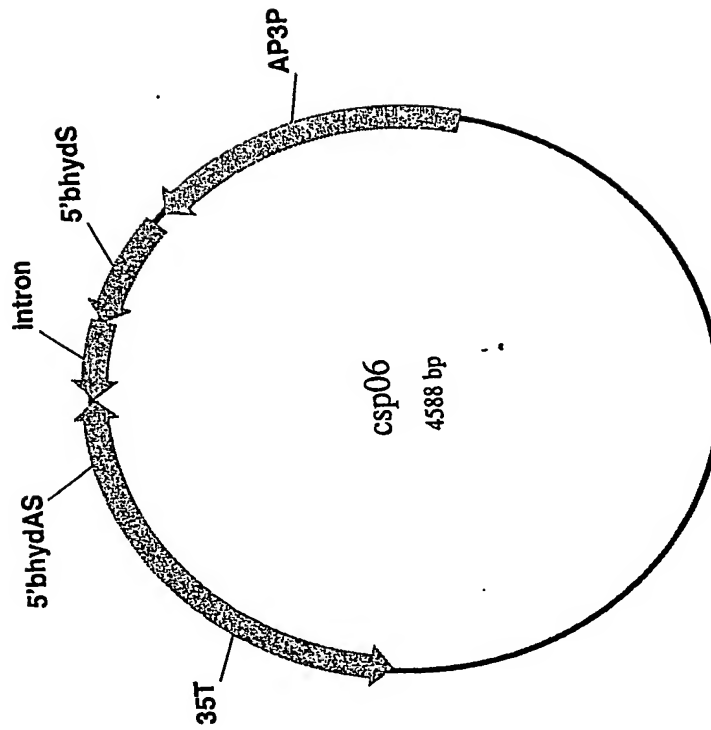


Abbildung 37: pSUN5 Konstrukt zur Runterregulierung der endogenen Tagetes-Ecyclyase sowie Ueberexpression der NP196 Ketolase und der Tomaten-b-Hydroxylase

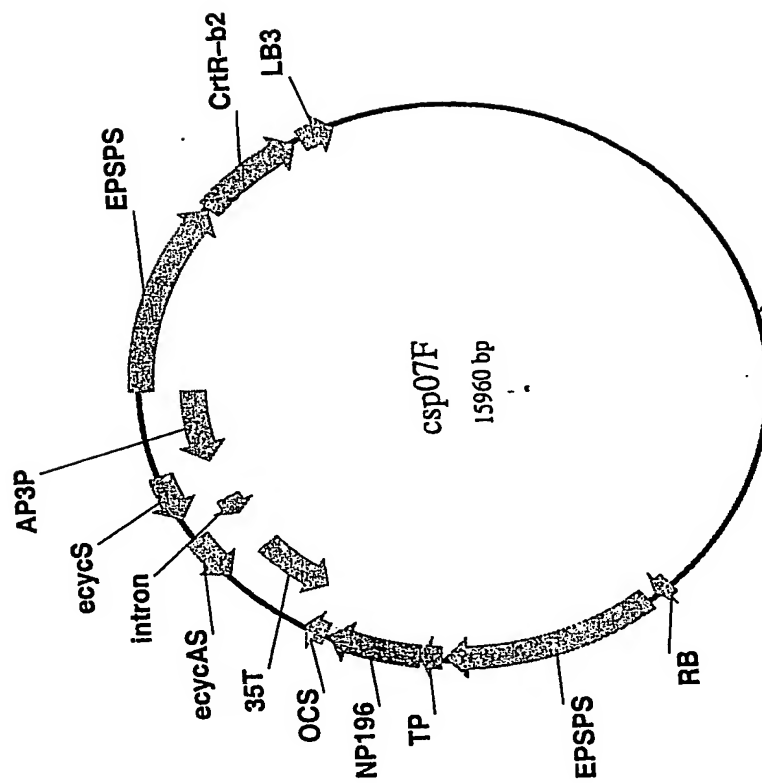


Abbildung 38: pSUN5 Konstrukt zur zur Runterregulierung der endogenen Tagetes-Ecyclyase und Runterregulierung der endogenen Tagetes-b-Hydroxylase sowie Ueberexpression der NP196 Ketolase und der Tomaten-b-Hydroxylase

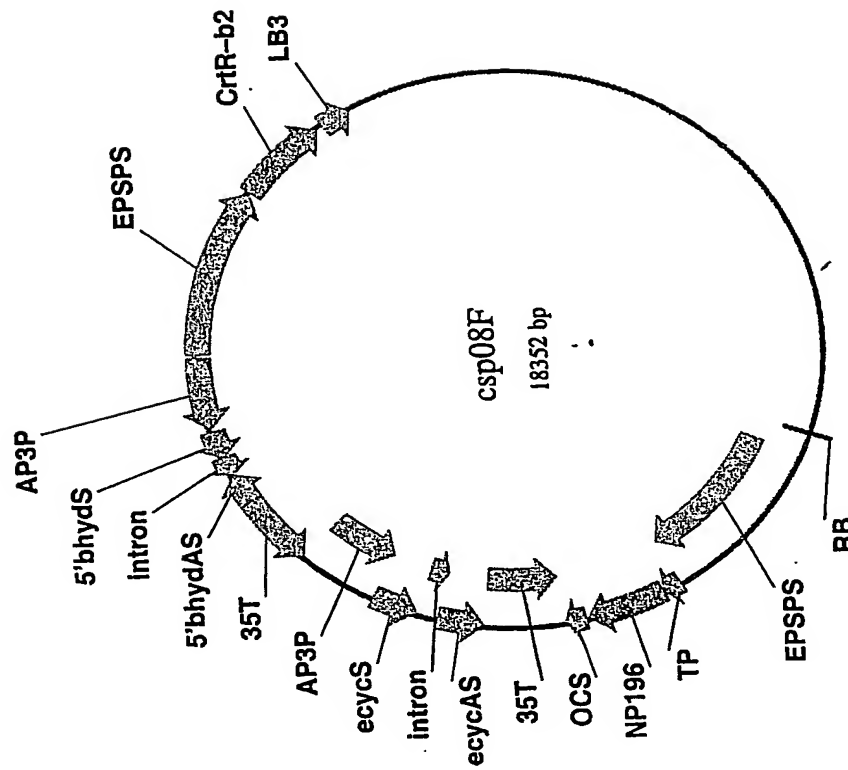


Abbildung 39: pSUN5 Konstrukt zur Runterregulierung der endogenen Tagetes-Ecyclyase und Runterregulierung der endogenen Tagetes-b-Hydroxylase sowie Ueberexpression der NP196 Ketolase und der Tomaten-b-Hydroxylase und des B-Genes aus Tomate

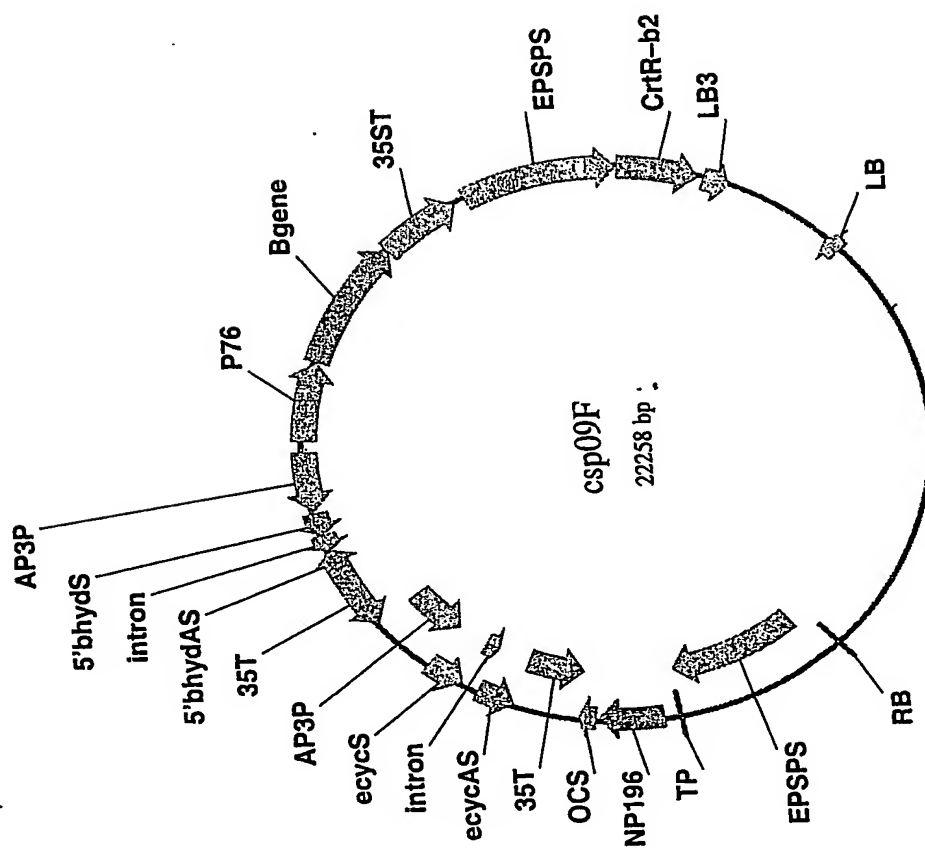


Abbildung 40: pSUN5 Konstrukt Uebersetzung der NP196 Ketolase  
und der Tomaten-b-Hydroxylase

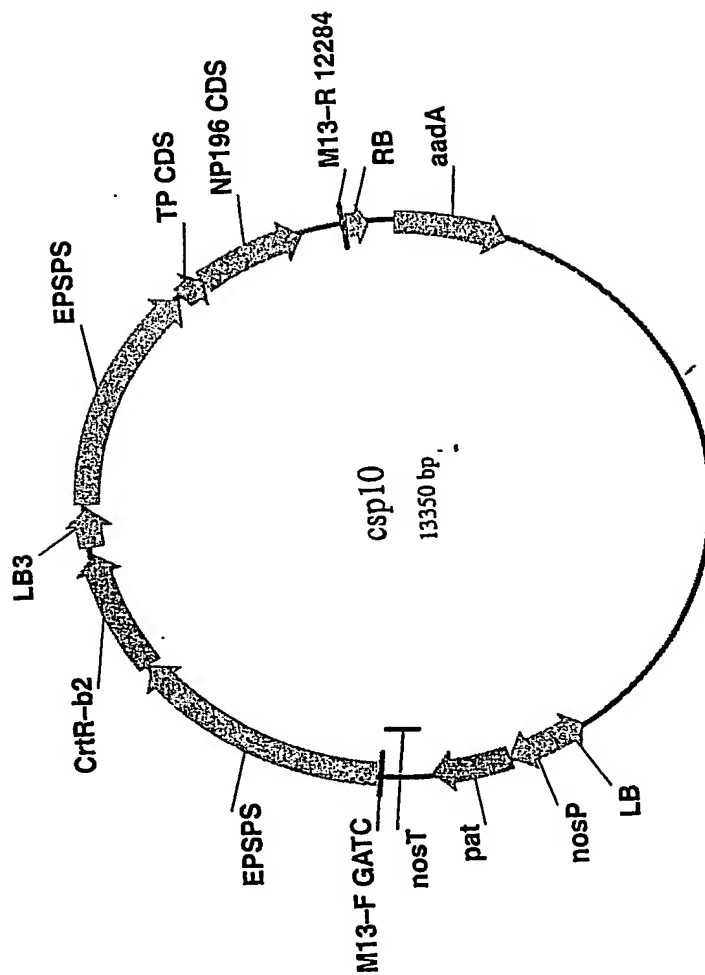


Abbildung 41: pSUN5 Konstrukt zur Runterregulierung der endogenen Tagetes-b-Hydroxylase sowie Ueberexpression der NP196 Ketolase und der Tomaten-b-Hydroxylase

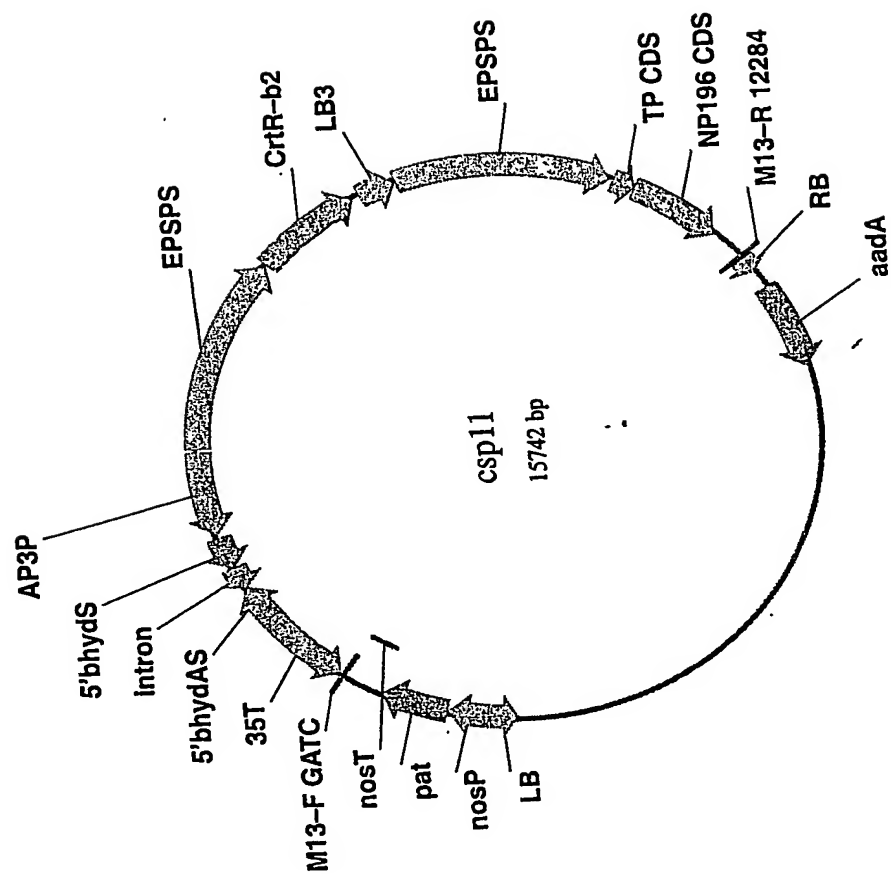


Abbildung 42: pSUN5 Konstrukt zur Runterregulierung der endogenen Tagetes-b-Hydroxylase sowie Ueberexpression der NP196 Ketolase, des B-Genes und der Tomaten-b-Hydroxylase

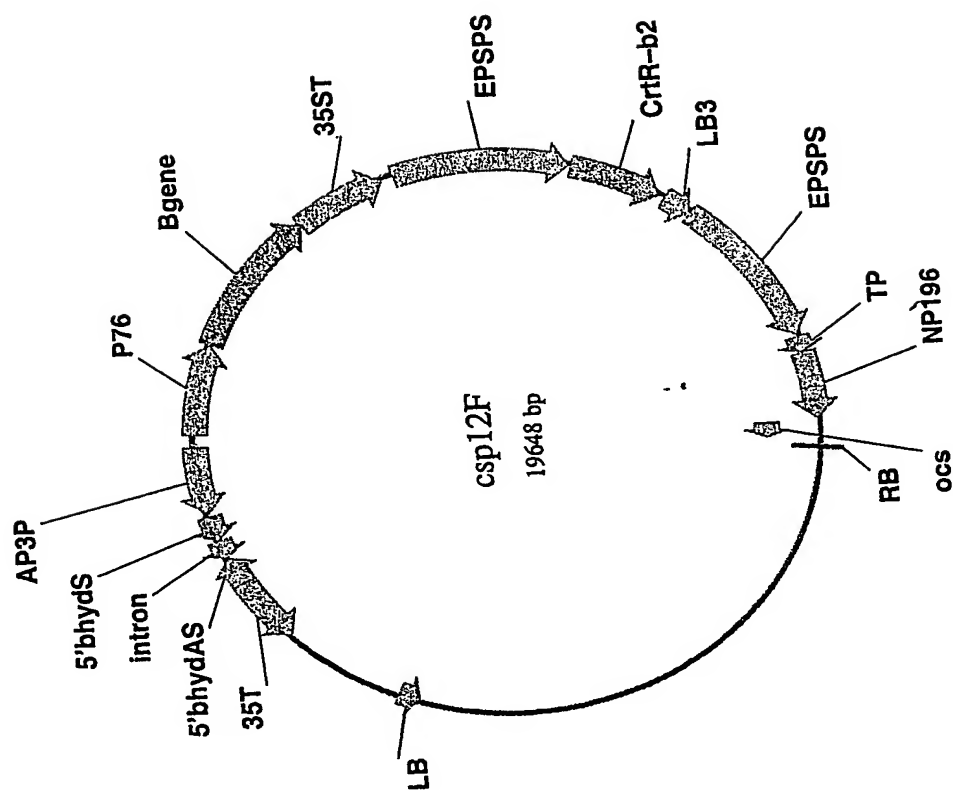


Abbildung 43: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Expression der chromoplastenspezifischen Lycopin beta cyclase aus *Lyco-persicon esculentum* unter Kontrolle des Promoters P76 und zur blütenspezifischen Expression der Ketolase NP196 aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 unter Kontrolle des EPSPS Promoters

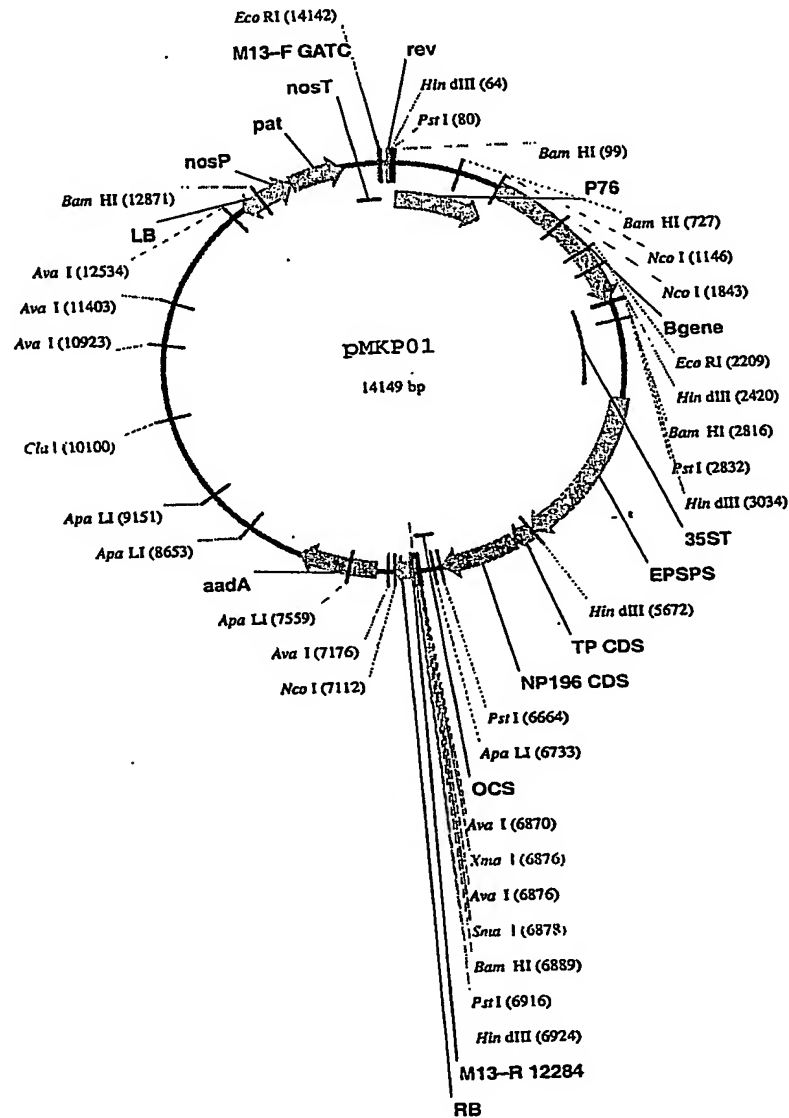
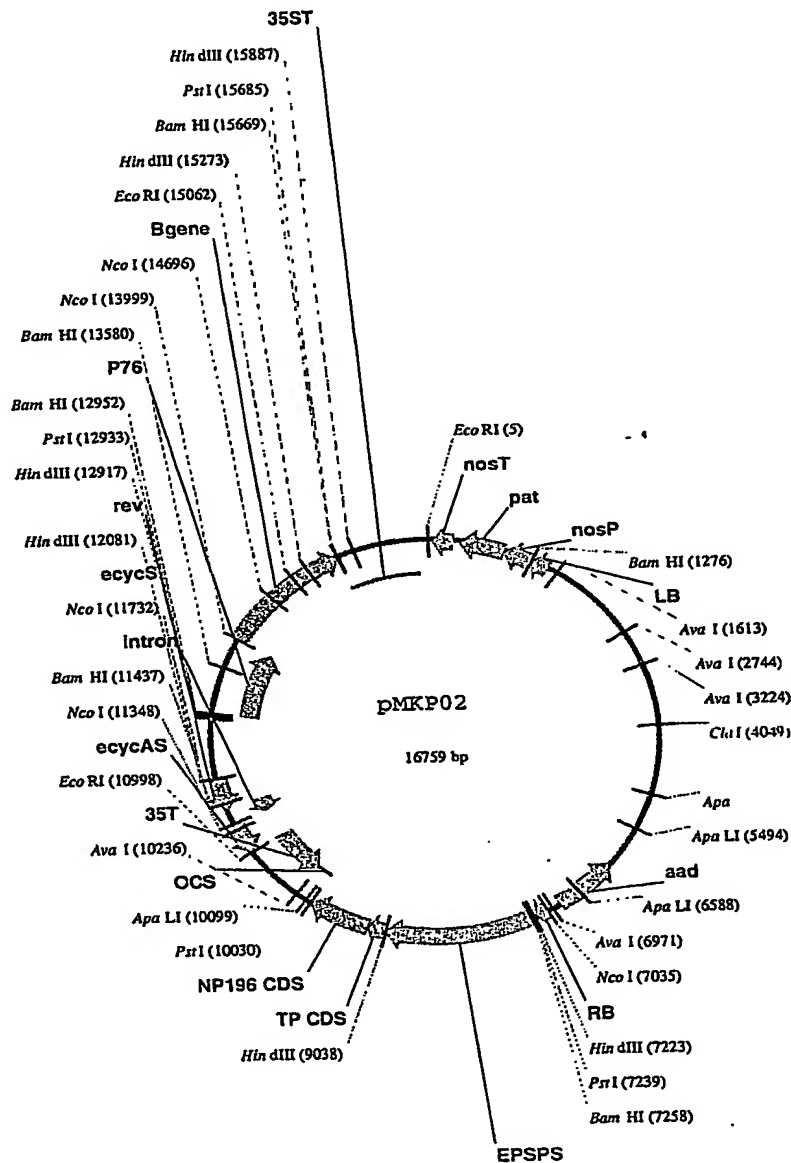




Abbildung 44: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Expression der chromoplastenspezifischen Lycopin beta cyclase aus *Lycopersicon esculentum* unter Kontrolle des Promoters P76, zur blütenspezifischen Expression der Ketolase NP196 aus *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 unter Kontrolle des EPSPS Promoters und zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend 5' terminale Fragmente der Epsilon-Cyclase cDNA (AF251016) unter Kontrolle des AP3P-Promoters



SEQUENCE LISTING

5 <110> SunGene GmbH Co. KGaA

10 <120> Verfahren zur Herstellung von Astaxanthin in Blueten von Pflanzen

<130> PF 53862

15 <160> 172

20 <170> PatentIn version 3.1

25 <210> 1

<211> i771

<212> DNA

30 <213> Haematococcus pluvialis

35 <220>

<221> CDS

<222> (166) .. (1155)

40 <223>

45 <400> 1

ggcacgagct tgcacgcaag tcagcgcgcg caagtcaaca cctgccgggc cacagcctca 60

aataataaag agctcaagcg tttgtgcgcc tcgacgtggc cagtctgcac tgccttgaac 120

50 ccgcgagtct cccgccgcac tgactgccat agcacagcta gacga atg cag cta gca 177

Met Gln Leu Ala

1

5	gcg aca gta atg ttg gag cag ctt acc gga agc gct gag gca ctc aag Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala Glu Ala Leu Lys 5 10 15 20	225
10	gag aag gag aag gag gtt gca ggc agc tct gac gtg ttg cgt aca tgg Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val Leu Arg Thr Trp 25 30 35	273
15	gcg acc cag tac tcg ctt ccg tca gaa gag tca gac gcg gcc cgc ccg Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp Ala Ala Arg Pro 40 45 50	321
20	gga ctg aag aat gcc tac aag cca cca cct tcc gac aca aag ggc atc Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp Thr Lys Gly Ile 55 60 65	369
25	aca atg gcg cta cgt gtc atc ggc tcc tgg gcc gca gtg ttc ctc cac Thr Met Ala Leu Arg Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala Val Phe Leu His 70 75 80	417
30	gcc att ttt caa atc aag ctt ccg acc tcc ttg gac cag ctg cac tgg Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp Gln Leu His Trp 85 90 95 100	465
35	ctg ccc gtg tca gat gcc aca gct cag ctg gtt agc ggc acg agc agc Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser Gly Thr Ser Ser 105 110 115	513
40	ctg ctc gac atc gtc gta gta ttc ttt gtc ctg gag ttc ctg tac aca Leu Leu Asp Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr 120 125 130	561
45	ggc ctt ttt atc acc acg cat gat gct atg cat ggc acc atc gcc atg Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly Thr Ile Ala Met 135 140 145	609
50	aga aac agg cag ctt aat gac ttc ttg ggc aga gta tgc atc tcc ttg Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val Cys Ile Ser Leu 150 155 160	657
55	tac gcc tgg ttt gat tac aac atg ctg cac cgc aag cat tgg gag cac Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys His Trp Glu His 165 170 175 180	705
60	cac aac cac act ggc gag gtg ggc aag gac cct gac ttc cac agg gga His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp Phe His Arg Gly 185 190 195	753

	aac cct ggc att gtg ccc tgg ttt gcc agc ttc atg tcc agc tac atg	801
	Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met	
	200 205 210	
5	tcg atg tgg cag ttt gcg cgc ctc gca tgg tgg acg gtg gtc atg cag	849
	Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr Val Val Met Gln	
	215 220 225	
10	ctg ctg ggt gcg cca atg gcg aac ctg ctg gtg ttc atg gcg gcc gcg	897
	Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe Met Ala Ala Ala	
	230 235 240	
	ccc atc ctg tcc gcc ttc cgc ttg ttc tac ttt ggc acg tac atg ccc	945
15	Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Tyr Met Pro	
	245 250 255 260	
	cac aag cct gag cct gcc gcc gcg tca ggc tct tca cca gcc gtc atg	993
	His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser Pro Ala Val Met	
20	265 270 275	
	aac tgg tgg aag tcg cgc act agc cag gcg tcc gac ctg gtc agc ttt	1041
	Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp Leu Val Ser Phe	
	280 285 290	
25	ctg acc tgc tac cac ttc gac ctg cac tgg gag cac cac cgc tgg ccc	1089
	Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His His Arg Trp Pro	
	295 300 305	
30	ttc gcc ccc tgg tgg gag ctg ccc aac tgc cgc cgc ctg tct ggc cga	1137
	Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg	
	310 315 320	
	ggt ctg gtt cct gcc tag ctggacacac tgcagtgggc cctgctgcc	1185
35	Gly Leu Val Pro Ala	
	325	
	gctgggcatg caggttgtgg caggactggg tgaggtgaaa agctgcaggc gctgctgccg	1245
40	gacacgctgc atgggctacc ctgtgtagct gccgccacta ggggaggggg tttgtagctg	1305
	tcgagcttgc cccatggatg aagctgtgta gtgggtgcagg gactacaccc acaggccaac	1365
	acccttgacg gagatgtctt gcgtcgggag gactgttggg cagtgtagat gctatgattg	1425
45	tatcttaatg ctgaagcett taggggagcg acacttagtg ctgggcaggc aacgccctgc	1485
	aaggtgcagg cacaagctag gctggacgag gactcgggtg caggcagggtg aagaggtgcg	1545
50	ggaggggtggt gccacacca ctgggcaaga ccatgctgca atgctggcgg tgtggcagtg	1605

agagctgcgt gattaactgg gctatggatt gtttgagcag tctcacttat tctttgatat 1665  
 agatactggt caggcaggtc aggagagtga gtatgaacaa gttgagaggt ggtgcgctgc 1725  
 5 cctgcgctt atgaagctgt aacaataaag tgggtcaaaa aaaaaa 1771  
  
 <210> 2  
 10 <211> 329  
 <212> PRT  
 15 <213> Haematococcus pluvialis  
  
 <400> 2  
 20 Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala  
 1 5 10 15  
 25 Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val  
 20 25 30  
 30 Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp  
 35 40 45  
 Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp  
 50 55 60  
 Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Arg Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala  
 65 70 75 80  
 40 Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp  
 85 90 95  
 45 Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser  
 100 105 110  
 50 Gly Thr Ser Ser Leu Leu Asp Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu  
 115 120 125

5 Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly  
 130 135 140

10 Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val  
 145 150 155 160

15 Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys  
 165 170 175

20 His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp  
 180 185 190

Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met  
 195 200 205

25 Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr  
 210 215 220

Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe  
 225 230 235 240

30 Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly  
 245 250 255

35 Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser  
 260 265 270

40 Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp  
 275 280 285

45 Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His  
 290 295 300

His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg  
 305 310 315 320

50

Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala  
325

5 <210> 3  
 <211> 1662  
 <212> DNA  
 10 <213> Haematococcus pluvialis

15 <220>  
 ● <221> CDS  
 <222> (168)..(1130)  
 20 <223>

25 <400> 3  
 cggggcaact caagaaattc aacagctgca agcgcgcccc agcctcacag cgccaagtga 60  
 gctatcgacg tgggtgtgag cgctcgacgt ggtccactga cgggcctgtg agcctctgcg 120  
 30 ctccgtctctc tgccaaatct cgcgtcgggg cctgcctaag tcgaaga atg cac gtc 176  
 Met His Val  
 1  
 gca tcg gca cta atg gtc gag cag aaa ggc agt gag gca gct gct tcc 224  
 Ala Ser Ala Leu Met Val Glu Gln Lys Gly Ser Glu Ala Ala Ala Ser  
 5 10 15  
 agc cca gac gtc ttg aga gcg tgg gcg aca cag tat cac atg cca tcc 272  
 Ser Pro Asp Val Leu Arg Ala Trp Ala Thr Gln Tyr His Met Pro Ser  
 40 20 25 30 35  
 gag tcg tca gac gca gct cgt cct gcg cta aag cac gcc tac aaa cct 320  
 Glu Ser Ser Asp Ala Ala Arg Pro Ala Leu Lys His Ala Tyr Lys Pro  
 40 45 50  
 45 cca gca tct gac gcc aag ggc atc acg atg gcg ctg acc atc att ggc 368  
 Pro Ala Ser Asp Ala Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Thr Ile Ile Gly  
 55 60 65  
 50 acc tgg acc gca gtg ttt tta cac gca ata ttt caa atc agg cta ccg 416

	Thr	Trp	Thr	Ala	Val	Phe	Leu	His	Ala	Ile	Phe	Gln	Ile	Arg	Leu	Pro	
	70						75						80				
5	aca	tcc	atg	gac	cag	ctt	cac	tgg	ttg	cct	gtg	tcc	gaa	gcc	aca	gcc	464
	Thr	Ser	Met	Asp	Gln	Leu	His	Trp	Leu	Pro	Val	Ser	Glu	Ala	Thr	Ala	
	85						90						95				
10	cag	ctt	ttg	ggc	gga	agc	agc	agc	cta	ctg	cac	atc	gct	gca	gtc	ttc	512
	Gln	Leu	Leu	Gly	Gly	Ser	Ser	Ser	Leu	Leu	His	Ile	Ala	Ala	Val	Phe	
	100					105					110				115		
15	att	gta	ctt	gag	ttc	ctg	tac	act	ggc	cta	ttc	atc	acc	aca	cat	gac	560
	Ile	Val	Leu	Glu	Phe	Leu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Phe	Ile	Thr	Thr	His	Asp	
	120								125						130		
	gca	atg	cat	ggc	acc	ata	gct	ttg	agg	cac	agg	cag	ctc	aat	gat	ctc	608
	Ala	Met	His	Gly	Thr	Ile	Ala	Leu	Arg	His	Arg	Gln	Leu	Asn	Asp	Leu	
	135								140						145		
20	ctt	ggc	aac	atc	tgc	ata	tca	ctg	tac	gcc	tgg	ttt	gac	tac	agc	atg	656
	Leu	Gly	Asn	Ile	Cys	Ile	Ser	Leu	Tyr	Ala	Trp	Phe	Asp	Tyr	Ser	Met	
	150							155					160				
25	ctg	cat	cgc	aag	cac	tgg	gag	cac	cac	aac	cat	act	ggc	gaa	gtg	ggg	704
	Leu	His	Arg	Lys	His	Trp	Glu	His	His	Asn	His	Thr	Gly	Glu	Val	Gly	
	165					170						175					
30	aaa	gac	cct	gac	ttc	cac	aag	gga	aat	ccc	ggc	ctt	gtc	ccc	tgg	ttc	752
	Lys	Asp	Pro	Asp	Phe	His	Lys	Gly	Asn	Pro	Gly	Leu	Val	Pro	Trp	Phe	
	180					185					190				195		
35	gcc	agc	ttc	atg	tcc	agc	tac	atg	tcc	ctg	tgg	cag	ttt	gcc	cgg	ctg	800
	Ala	Ser	Phe	Met	Ser	Ser	Tyr	Met	Ser	Leu	Trp	Gln	Phe	Ala	Arg	Leu	
	200								205						210		
40	gca	tgg	tgg	gca	gtg	gtg	atg	caa	atg	ctg	ggg	gcg	ccc	atg	gca	aat	848
	Ala	Trp	Trp	Ala	Val	Val	Met	Gln	Met	Leu	Gly	Ala	Pro	Met	Ala	Asn	
	215							220					225				
45	ctc	cta	gtc	ttc	atg	gct	gca	gcc	cca	atc	ttg	tca	gca	ttc	cgc	ctc	896
	Leu	Leu	Val	Phe	Met	Ala	Ala	Ala	Pro	Ile	Leu	Ser	Ala	Phe	Arg	Leu	
	230						235						240				
50	ttc	tac	ttc	ggc	act	tac	ctg	cca	cac	aag	cct	gag	cca	ggc	cct	gca	944
	Phe	Tyr	Phe	Gly	Thr	Tyr	Leu	Pro	His	Lys	Pro	Glu	Pro	Gly	Pro	Ala	
	245						250					255					
55	gca	ggc	tct	cag	gtg	atg	gcc	tgg	ttc	agg	gcc	aag	aca	agt	gag	gca	992
	Ala	Gly	Ser	Gln	Val	Met	Ala	Trp	Phe	Arg	Ala	Lys	Thr	Ser	Glu	Ala	
	260					265					270				275		



tct gat gtg atg agt ttc ctg aca tgc tac cac ttt gac ctg cac tgg 1040  
 Ser Asp Val Met Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp  
 280 285 290

5

gag cac cac agg tgg ccc ttt gcc ccc tgg tgg cag ctg ccc cac tgc 1088  
 Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Gln Leu Pro His Cys  
 295 300 305

10

cgc cgc ctg tcc ggg cgt ggc ctg gtg cct gcc ttg gca tga 1130  
 Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Leu Ala  
 310 315 320

15

cctgggtccct ccgctggtga cccagcgtct gcacaagagt gtcattgctac aggggtgctgc 1190  
 ggccagtggc agcgagctgc actctcagcc tgtatggggc taccgctgtg ccactgagca 1250  
 ctgggcatgc cactgagcac tgggcgtgct actgagcaat gggcgtgcta ctgagcaatg 1310

20

ggcgtgctac tgacaatggg cgtgctactg gggctctggca gtggctagga tggagtttga 1370  
 tgcattcagt agcgggtggc aacgtcatgt ggatgggtgga agtgctgagg ggtttaggca 1430

25

gccggcattt gagaggggcta agttataaat cgcattgctgc tcatgcgcac atatctgcac 1490  
 acagccaggg aaatcccttc gagagtgatt atgggacact tgtattgggt tcgtgctatt 1550  
 gttttattca gcagcagtac ttagtgaggg tgagagcagg gtggtgagag tggagtgagt 1610

30

gagtatgaac ctggtcagcg aggtgaacag cctgtaatga atgactctgt ct 1662

<210> 4

5

<211> 320

<212> PRT

40

<213> Haematococcus pluvialis

<400> 4

45

Met His Val Ala Ser Ala Leu Met Val Glu Gln Lys Gly Ser Glu Ala  
 1 5 10 15

50

Ala Ala Ser Ser Pro Asp Val Leu Arg Ala Trp Ala Thr Gln Tyr His  
 20 25 30

Met Pro Ser Glu Ser Ser Asp Ala Ala Arg Pro Ala Leu Lys His Ala  
 35 40 45  
 5  
 Tyr Lys Pro Pro Ala Ser Asp Ala Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Thr  
 50 55 60  
 10  
 Ile Ile Gly Thr Trp Thr Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile  
 65 70 75 80  
 15 Arg Leu Pro Thr Ser Met Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Glu  
 85 90 95  
 20 Ala Thr Ala Gln Leu Leu Gly Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Ala  
 100 105 110  
 25 Ala Val Phe Ile Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr  
 115 120 125  
 30 Thr His Asp Ala Met His Gly Thr Ile Ala Leu Arg His Arg Gln Leu  
 130 135 140  
 35 Asn Asp Leu Leu Gly Asn Ile Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp  
 145 150 155 160  
 40 Tyr Ser Met Leu His Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly  
 165 170 175  
 45 Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp Phe His Lys Gly Asn Pro Gly Leu Val  
 180 185 190  
 50 Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Leu Trp Gln Phe  
 195 200 205  
 Ala Arg Leu Ala Trp Trp Ala Val Val Met Gln Met Leu Gly Ala Pro  
 210 215 220

## 10

Met Ala Asn Leu Leu Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala  
 225 230 235 240

5 Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Glu Pro  
 245 250 255

10 Gly Pro Ala Ala Gly Ser Gln Val Met Ala Trp Phe Arg Ala Lys Thr  
 260 265 270

15 Ser Glu Ala Ser Asp Val Met Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp  
 275 280 285

20 Leu His Trp Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Gln Leu  
 290 295 300

Pro His Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Leu Ala  
 305 310 315 320

25 <210> 5

<211> 729

<212> DNA

30

<213> Agrobacterium aurantiacum

35 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(729)

40

<223>

45 <400> 5

atg agc gca cat gcc ctg ccc aag gca gat ctg acc gcc acc agc ctg 48  
 Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu  
 1 5 10 15

50 atc gtc tcg ggc ggc atc atc gcc gct tgg ctg gcc ctg cat gtg cat 96

	Ile Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His	
	20 25 30	
5	gcg ctg tgg ttt ctg gac gca gcg gcg cat ccc atc ctg gcg atc gca Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Ile Ala	144
	35 40 45	
10	aat ttc ctg ggg ctg acc tgg ctg tcg gtc gga ttg ttc atc atc gcg Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala	192
	50 55 60	
15	cat gac gcg atg cac ggg tcg gtg gtg ccg ggg cgt ccg cgc gcc aat His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn	240
	65 70 75 80	
20	gcg gcg atg ggc cag ctt gtc ctg tgg ctg tat gcc gga ttt tcg tgg Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp	288
	85 90 95	
25	cgc aag atg atc gtc aag cac atg gcc cat cac cgc cat gcc gga acc Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr	336
	100 105 110	
30	gac gac gac ccc gat ttc gac cat ggc ggc ccg gtc cgc tgg tac gcc Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala	384
	115 120 125	
35	cgc ttc atc ggc acc tat ttc ggc tgg cgc gag ggg ctg ctg ctg ccc Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro	432
	130 135 140	
40	gtc atc gtg acg gtc tat gcg ctg atc ctt ggg gat cgc tgg atg tac Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr	480
	145 150 155 160	
45	gtg gtc ttc tgg ccg ctg ccg tcg atc ctg gcg tcg atc cag ctg ttc Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe	528
	165 170 175	
50	gtg ttc ggc acc tgg ctg ccg cac cgc ccc ggc cac gac gcg ttc ccg Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro	576
	180 185 190	
55	gac cgc cac aat gcg cgg tcg tcg cgg atc agc gac ccc gtg tcg ctg Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu	624
	195 200 205	
60	ctg acc tgc ttt cac ttt ggc ggt tat cat cac gaa cac cac ctg cac Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His	672
	210 215 220	

ccg acg gtg ccg tgg tgg cgc ctg ccc agc acc cgc acc aag ggg gac 720  
 Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp  
 225 230 235 240  
 5  
 acc gca tga 729  
 Thr Ala  
 10  
 <210> 6  
 <211> 242  
 15 <212> PRT  
 <213> Agrobacterium aurantiacum  
 20  
 <400> 6  
 Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu  
 1 5 10 15  
 25  
 Ile Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His  
 20 25 30  
 30  
 Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Ile Ala  
 35 40 45  
 35 Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala  
 50 55 60  
 40 His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn  
 65 70 75 80  
 Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp  
 85 90 95  
 45  
 Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr  
 100 105 110  
 50

13

Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala  
115 120 125

5 Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro  
130 135 140

10 Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr  
145 150 155 160

15 Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe  
165 170 175

Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro  
180 185 190

20 Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu  
195 200 205

25 Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His  
210 215 220

30 Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp  
225 230 235 240

Thr Ala

35

<210> 7

<211> 1631

40

<212> DNA

<213> Alcaligenes sp.

45

<220>

<221> CDS

50

&lt;222&gt; (99) .. (827)

&lt;223&gt;

5

&lt;400&gt; 7

ctgcaggccg ggcccgtgg ccaatggtcg caaccggcag gactggaaca ggacggcggg 60

10 ccggtctagg ctgtcgccct acgcagcagg agtttcgg atg tcc gga cgg aag cct 116  
 Met Ser Gly Arg Lys Pro  
 1 5

15 ggc aca act ggc gac acg atc gtc aat ctc ggt ctg acc gcc gcg atc 164  
 Gly Thr Thr Gly Asp Thr Ile Val Asn Leu Gly Leu Thr Ala Ala Ile  
 10 15 20

20 ctg ctg tgc tgg ctg gtc ctg cac gcc ttt acg cta tgg ttg cta gat 212  
 Leu Leu Cys Trp Leu Val Leu His Ala Phe Thr Leu Trp Leu Leu Asp  
 25 30 35

25 gcg gcc gcg cat ccg ctg ctt gcc gtg ctg tgc ctg gct ggg ctg acc 260  
 Ala Ala Ala His Pro Leu Leu Ala Val Leu Cys Leu Ala Gly Leu Thr  
 40 45 50

30 tgg ctg tgc gtc ggg ctg ttc atc atc gcg cat gac gca atg cac ggg 308  
 Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala His Asp Ala Met His Gly  
 55 60 65 70

30 tcc gtg gtg ccg ggg cgg ccg cgc gcc aat gcg gcg atc ggg caa ctg 356  
 Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn Ala Ala Ile Gly Gln Leu  
 75 80 85

35 gcg ctg tgg ctc tat gcg ggg ttc tgc tgg ccc aag ctg atc gcc aag 404  
 Ala Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp Pro Lys Leu Ile Ala Lys  
 90 95 100

40 cac atg acg cat cac cgg cac gcc ggc acc gac aac gat ccc gat ttc 452  
 His Met Thr His His Arg His Ala Gly Thr Asp Asn Asp Pro Asp Phe  
 105 110 115

45 ggt cac gga ggg ccc gtg cgc tgg tac ggc agc ttc gtc tcc acc tat 500  
 Gly His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Gly Ser Phe Val Ser Thr Tyr  
 120 125 130

50 ttc ggc tgg cga gag gga ctg ctg cta ccg gtg atc gtc acc acc tat 548  
 Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro Val Ile Val Thr Thr Tyr  
 135 140 145 150

50 gcg ctg atc ctg ggc gat cgc tgg atg tat gtc atc ttc tgg ccg gtc 596

15

Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr Val Ile Phe Trp Pro Val  
 155 160 165

5 ccg gcc gtt ctg gcg tcg atc cag att ttc gtc ttc gga act tgg ctg 644  
 Pro Ala Val Leu Ala Ser Ile Gln Ile Phe Val Phe Gly Thr Trp Leu  
 170 175 180

10 ccc cac cgc ccg gga cat gac gat ttt ccc gac cgg cac aac gcg agg 692  
 Pro His Arg Pro Gly His Asp Asp Phe Pro Asp Arg His Asn Ala Arg  
 185 190 195

15 tcg acc ggc atc ggc gac ccg ttg tca cta ctg acc tgc ttc cat ttc 740  
 Ser Thr Gly Ile Gly Asp Pro Leu Ser Leu Leu Thr Cys Phe His Phe  
 200 205 210

ggc ggc tat cac cac gaa cat cac ctg cat ccg cat gtg ccg tgg tgg 788  
 Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His Pro His Val Pro Trp Trp  
 215 220 225 230

20 cgc ctg cct cgt aca cgc aag acc gga ggc cgc gca tga cgcaattcct 837  
 Arg Leu Pro Arg Thr Arg Lys Thr Gly Gly Arg Ala  
 235 240

25 cattgtcgtg gcgacagtcc tcgtgatgga gctgaccgcc tattccgtcc accgctggat 897  
 tatgcacggc cccctaggct ggggctggca caagtcccat cacgaagagc acgaccacgc 957  
 gttggagaag aacgacctct acggcgctcgt cttcgcggtg ctggcgacga tcctcttcac 1017

30 cgtgggcgcc tattggtggc cgggtgctgtg gtggatcgcc ctgggcatga cggctctatgg 1077  
 gttgatctat ttcactctgc acgacgggct tgtgcatcaa cgctggccgt ttcggtatat 1137  
 tccgcggcgg ggctatttcc gcaggctcta ccaagctcat cgcctgcacc acgcggtcga 1197

35 ggggcggggac cactgcgtca gcttcggctt catctatgcc ccacccgtgg acaagctgaa 1257  
 gcaggatctg aagcggtcgg gtgtcctgcg cccccaggac gagcgtccgt cgtgatctct 1317

40 gatcccgcg tgcccgcatg aaatccgacg tgetgctggc aggggcggc cttgccaacg 1377  
 gactgatcgc gctggcgatc cgcaaggcgc ggcccgacct tcgcgtgctg ctgctggacc 1437  
 gtgcggcggg cgcctcggac gggcatactt ggtcctgcca cgacaccgat ttggcgccgc 1497

45 actggctgga ccgcctgaag ccgatcaggc gtggcgactg gcccgatcag gaggtgcggt 1557  
 tcccagacca ttcgcgaagg ctccgggccc gatatggctc gatcgacggg cgggggctga 1617

50 tgcgtgcggt gacc 1631



&lt;210&gt; 8

5 &lt;211&gt; 242

&lt;212&gt; PRT

10 &lt;213&gt; Alcaligenes sp.

&lt;400&gt; 8

15 Met Ser Gly Arg Lys Pro Gly Thr Thr Gly Asp Thr Ile Val Asn Leu  
 1 5 10 15

20 Gly Leu Thr Ala Ala Ile Leu Leu Cys Trp Leu Val Leu His Ala Phe  
 20 25 30

25 Thr Leu Trp Leu Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Leu Leu Ala Val Leu  
 35 40 45

Cys Leu Ala Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala  
 50 55 60

30 His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn  
 65 70 75 80

35 Ala Ala Ile Gly Gln Leu Ala Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp  
 85 90 95

40 Pro Lys Leu Ile Ala Lys His Met Thr His His Arg His Ala Gly Thr  
 100 105 110

45 Asp Asn Asp Pro Asp Phe Gly His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Gly  
 115 120 125

Ser Phe Val Ser Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro  
 130 135 140

50

17

Val Ile Val Thr Thr Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr  
145 150 155 160

5 Val Ile Phe Trp Pro Val Pro Ala Val Leu Ala Ser Ile Gln Ile Phe  
165 170 175

10 Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Asp Phe Pro  
180 185 190

15 Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Thr Gly Ile Gly Asp Pro Leu Ser Leu  
195 200 205

Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His  
210 215 220

20 Pro His Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Arg Thr Arg Lys Thr Gly Gly  
225 230 235 240

25 Arg Ala

30 <210> 9

<211> 729

<212> DNA

35 <213> Paracoccus marcusii

40 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(729)

45 <223>

50 <400> 9  
atg agc gca cat gcc ctg ccc aag gca gat ctg acc gcc aca agc ctg

## 18

	Met	Ser	Ala	His	Ala	Leu	Pro	Lys	Ala	Asp	Leu	Thr	Ala	Thr	Ser	Leu	
	1				5					10					15		
5	atc	gtc	tcg	ggc	ggc	atc	atc	gcc	gca	tgg	ctg	gcc	ctg	cat	gtg	cat	96
	Ile	Val	Ser	Gly	Gly	Ile	Ile	Ala	Ala	Trp	Leu	Ala	Leu	His	Val	His	
				20					25					30			
10	gcg	ctg	tgg	ttt	ctg	gac	gcg	gcg	gcc	cat	ccc	atc	ctg	gcg	gtc	gcg	144
	Ala	Leu	Trp	Phe	Leu	Asp	Ala	Ala	Ala	His	Pro	Ile	Leu	Ala	Val	Ala	
				35					40					45			
15	aat	ttc	ctg	ggg	ctg	acc	tgg	ctg	tcg	gtc	gga	ttg	ttc	atc	atc	gcg	192
	Asn	Phe	Leu	Gly	Leu	Thr	Trp	Leu	Ser	Val	Gly	Leu	Phe	Ile	Ile	Ala	
				50					55					60			
20	cat	gac	gcg	atg	cac	ggg	tcg	gtc	gtg	ccg	ggg	cgt	ccg	cgc	gcc	aat	240
	His	Asp	Ala	Met	His	Gly	Ser	Val	Val	Pro	Gly	Arg	Pro	Arg	Ala	Asn	
				65					70					75		80	
25	gcg	gcg	atg	ggc	cag	ctt	gtc	ctg	tgg	ctg	tat	gcc	gga	ttt	tcg	tgg	288
	Ala	Ala	Met	Gly	Gln	Leu	Val	Leu	Trp	Leu	Tyr	Ala	Gly	Phe	Ser	Trp	
					85					90					95		
30	cgc	aag	atg	atc	gtc	aag	cac	atg	gcc	cat	cac	cgc	cat	gcc	gga	acc	336
	Arg	Lys	Met	Ile	Val	Lys	His	Met	Ala	His	His	Arg	His	Ala	Gly	Thr	
					100				105						110		
35	gac	gac	gac	cca	gat	ttc	gac	cat	ggc	ggc	ccg	gtc	cgc	tgg	tac	gcc	384
	Asp	Asp	Asp	Pro	Asp	Phe	Asp	His	Gly	Gly	Pro	Val	Arg	Trp	Tyr	Ala	
				115					120					125			
40	cgc	ttc	atc	ggc	acc	tat	ttc	ggc	tgg	cgc	gag	ggg	ctg	ctg	ctg	ccc	432
	Arg	Phe	Ile	Gly	Thr	Tyr	Phe	Gly	Trp	Arg	Glu	Gly	Leu	Leu	Leu	Pro	
				130					135					140			
45	gtc	atc	gtg	acg	gtc	tat	gcg	ctg	atc	ctg	ggg	gat	cgc	tgg	atg	tac	480
	Val	Ile	Val	Thr	Val	Tyr	Ala	Leu	Ile	Leu	Gly	Asp	Arg	Trp	Met	Tyr	
					145				150					155		160	
50	gtg	gtc	ttc	tgg	ccg	ttg	ccg	tcg	atc	ctg	gcg	tcg	atc	cag	ctg	ttc	528
	Val	Val	Phe	Trp	Pro	Leu	Pro	Ser	Ile	Leu	Ala	Ser	Ile	Gln	Leu	Phe	
					165					170					175		
45	gtg	ttc	ggc	act	tgg	ctg	ccg	cac	cgc	ccc	ggc	cac	gac	gcg	ttc	ccg	576
	Val	Phe	Gly	Thr	Trp	Leu	Pro	His	Arg	Pro	Gly	His	Asp	Ala	Phe	Pro	
				180					185						190		
50	gac	cgc	cat	aat	gcg	cgg	tcg	tcg	cgg	atc	agc	gac	cct	gtg	tcg	ctg	624
	Asp	Arg	His	Asn	Ala	Arg	Ser	Ser	Arg	Ile	Ser	Asp	Pro	Val	Ser	Leu	
				195					200								

ctg acc tgc ttt cat ttt ggc ggt tat cat cac gaa cac cac ctg cac 672  
 Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His  
 210 215 220  
 5  
 ccg acg gtg ccg tgg tgg cgc ctg ccc agc acc cgc acc aag ggg gac 720  
 Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp  
 225 230 235 240  
 10 acc gca tga 729  
 Thr Ala  
 15 <210> 10  
 <211> 242  
 <212> PRT  
 20 <213> Paracoccus marcusii  
 25 <400> 10  
 Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu  
 1 5 10 15  
 30  
 Ile Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His  
 20 25 30  
 35 Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Val Ala  
 35 40 45  
 40 Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala  
 50 55 60  
 His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn  
 65 70 75 80  
 45  
 Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp  
 85 90 95  
 50

## 20

Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr  
 100 105 110

5 Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala  
 115 120 125

10 Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro  
 130 135 140

15 Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr  
 145 150 155 160

Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe  
 165 170 175

20 Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro  
 180 185 190

25 Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu  
 195 200 205

30 Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His  
 210 215 220

35 Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp  
 225 230 235 240

Thr Ala

40  
 <210> 11  
 <211> 1629

45 <212> DNA  
 <213> Synechocystis

50

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

5 &lt;222&gt; (1)..(1629)

&lt;223&gt;

10

&lt;400&gt; 11

atg atc acc acc gat gtt gtc att att ggg gcg ggg cac aat ggc tta 48  
 Met Ile Thr Thr Asp Val Val Ile Ile Gly Ala Gly His Asn Gly Leu  
 1 5 10 15

15

gtc tgt gca gcc tat ttg ctc caa cgg ggc ttg ggg gtg acg tta cta 96  
 Val Cys Ala Ala Tyr Leu Leu Gln Arg Gly Leu Gly Val Thr Leu Leu  
 20 25 30

20

gaa aag cgg gaa gta cca ggg ggg gcg gcc acc aca gaa gct ctc atg 144  
 Glu Lys Arg Glu Val Pro Gly Gly Ala Ala Thr Thr Glu Ala Leu Met  
 35 40 45

25

ccg gag cta tcc ccc cag ttt cgc ttt aac cgc tgt gcc att gac cac 192  
 Pro Glu Leu Ser Pro Gln Phe Arg Phe Asn Arg Cys Ala Ile Asp His  
 50 55 60

30

gaa ttt atc ttt ctg ggg ccg gtg ttg cag gag cta aat tta gcc cag 240  
 Glu Phe Ile Phe Leu Gly Pro Val Leu Gln Glu Leu Asn Leu Ala Gln  
 65 70 75 80

35

tat ggt ttg gaa tat tta ttt tgt gac ccc agt gtt ttt tgt ccg ggg 288  
 Tyr Gly Leu Glu Tyr Leu Phe Cys Asp Pro Ser Val Phe Cys Pro Gly  
 85 90 95

ctg gat ggc caa gct ttt atg agc tac cgt tcc cta gaa aaa acc tgt 336  
 Leu Asp Gly Gln Ala Phe Met Ser Tyr Arg Ser Leu Glu Lys Thr Cys  
 100 105 110

40

gcc cac att gcc acc tat agc ccc cga gat gcg gaa aaa tat cgg caa 384  
 Ala His Ile Ala Thr Tyr Ser Pro Arg Asp Ala Glu Lys Tyr Arg Gln  
 115 120 125

45

ttt gtc aat tat tgg acg gat ttg ctc aac gct gtc cag cct gct ttt 432  
 Phe Val Asn Tyr Trp Thr Asp Leu Leu Asn Ala Val Gln Pro Ala Phe  
 130 135 140

50

aat gct ccg ccc cag gct tta cta gat tta gcc ctg aac tat ggt tgg 480  
 Asn Ala Pro Pro Gln Ala Leu Leu Asp Leu Ala Leu Asn Tyr Gly Trp  
 145 150 155 160

	gaa aac tta aaa tcc gtg ctg gcg atc gcc ggg tcg aaa acc aag gcg	528
	Glu Asn Leu Lys Ser Val Leu Ala Ile Ala Gly Ser Lys Thr Lys Ala	
	165 170 175	
5	ttg gat ttt atc cgc act atg atc ggc tcc ccg gaa gat gtg ctc aat	576
	Leu Asp Phe Ile Arg Thr Met Ile Gly Ser Pro Glu Asp Val Leu Asn	
	180 185 190	
10	gaa tgg ttc gac agc gaa cgg gtt aaa gct cct tta gct aga cta tgt	624
	Glu Trp Phe Asp Ser Glu Arg Val Lys Ala Pro Leu Ala Arg Leu Cys	
	195 200 205	
15	tcg gaa att ggc gct ccc cca tcc caa aag ggt agt agc tcc ggc atg	672
	Ser Glu Ile Gly Ala Pro Pro Ser Gln Lys Gly Ser Ser Ser Gly Met	
	210 215 220	
20	atg atg gtg gcc atg cgg cat ttg gag gga att gcc aga cca aaa gga	720
	Met Met Val Ala Met Arg His Leu Glu Gly Ile Ala Arg Pro Lys Gly	
	225 230 235 240	
25	ggc act gga gcc ctc aca gaa gcc ttg gtg aag tta gtg caa gcc caa	768
	Gly Thr Gly Ala Leu Thr Glu Ala Leu Val Lys Leu Val Gln Ala Gln	
	245 250 255	
30	ggg gga aaa atc ctc act gac caa acc gtc aaa cgg gta ttg gtg gaa	816
	Gly Gly Lys Ile Leu Thr Asp Gln Thr Val Lys Arg Val Leu Val Glu	
	260 265 270	
35	aac aac cag gcg atc ggg gtg gag gta gct aac gga gaa cag tac cgg	864
	Asn Asn Gln Ala Ile Gly Val Glu Val Ala Asn Gly Glu Gln Tyr Arg	
	275 280 285	
40	gcc aaa aaa ggc gtg att tct aac atc gat gcc cgc cgt tta ttt ttg	912
	Ala Lys Lys Gly Val Ile Ser Asn Ile Asp Ala Arg Arg Leu Phe Leu	
	290 295 300	
45	caa ttg gtg gaa ccg ggg gcc cta gcc aag gtg aat caa aac cta ggg	960
	Gln Leu Val Glu Pro Gly Ala Leu Ala Lys Val Asn Gln Asn Leu Gly	
	305 310 315 320	
50	gaa cga ctg gaa cgg cgc act gtg aac aat aac gaa gcc att tta aaa	1008
	Glu Arg Leu Glu Arg Arg Thr Val Asn Asn Asn Glu Ala Ile Leu Lys	
	325 330 335	
55	atc gat tgt gcc ctc tcc ggt tta ccc cac ttc act gcc atg gcc ggg	1056
	Ile Asp Cys Ala Leu Ser Gly Leu Pro His Phe Thr Ala Met Ala Gly	
	340 345 350	
60	ccg gag gat cta acg gga act att ttg att gcc gac tcg gta cgc cat	1104

## 23

	Pro	Glu	Asp	Leu	Thr	Gly	Thr	Ile	Leu	Ile	Ala	Asp	Ser	Val	Arg	His	
			355					360					365				
5	gtc	gag	gaa	gcc	cac	gcc	ctc	att	gcc	ttg	ggg	caa	att	ccc	gat	gct	1152
	Val	Glu	Glu	Ala	His	Ala	Leu	Ile	Ala	Leu	Gly	Gln	Ile	Pro	Asp	Ala	
			370				375				380						
10	aat	ccg	tct	tta	tat	ttg	gat	att	ccc	act	gta	ttg	gac	ccc	acc	atg	1200
	Asn	Pro	Ser	Leu	Tyr	Leu	Asp	Ile	Pro	Thr	Val	Leu	Asp	Pro	Thr	Met	
	385					390				395						400	
15	gcc	ccc	cct	ggg	cag	cac	acc	ctc	tgg	atc	gaa	ttt	ttt	gcc	ccc	tac	1248
	Ala	Pro	Pro	Gly	Gln	His	Thr	Leu	Trp	Ile	Glu	Phe	Phe	Ala	Pro	Tyr	
				405					410					415			
	cgc	atc	gcc	ggg	ttg	gaa	ggg	aca	ggg	tta	atg	ggc	aca	ggt	tgg	acc	1296
	Arg	Ile	Ala	Gly	Leu	Glu	Gly	Thr	Gly	Leu	Met	Gly	Thr	Gly	Trp	Thr	
			420				425					430					
20	gat	gag	tta	aag	gaa	aaa	gtg	gcg	gat	cgg	gtg	att	gat	aaa	tta	acg	1344
	Asp	Glu	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Asp	Arg	Val	Ile	Asp	Lys	Leu	Thr	
			435				440					445					
25	gac	tat	gcc	cct	aac	cta	aaa	tct	ctg	atc	att	ggt	cgc	cga	gtg	gaa	1392
	Asp	Tyr	Ala	Pro	Asn	Leu	Lys	Ser	Leu	Ile	Ile	Gly	Arg	Arg	Val	Glu	
		450				455					460						
30	agt	ccc	gcc	gaa	ctg	gcc	caa	cgg	ctg	gga	agt	tac	aac	ggc	aat	gtc	1440
	Ser	Pro	Ala	Glu	Leu	Ala	Gln	Arg	Leu	Gly	Ser	Tyr	Asn	Gly	Asn	Val	
	465				470				475					480			
35	tat	cat	ctg	gat	atg	agt	ttg	gac	caa	atg	atg	ttc	ctc	cgg	cct	cta	1488
	Tyr	His	Leu	Asp	Met	Ser	Leu	Asp	Gln	Met	Met	Phe	Leu	Arg	Pro	Leu	
			485				490					495					
	ccg	gaa	att	gcc	aac	tac	caa	acc	ccc	atc	aaa	aat	ctt	tac	tta	aca	1536
	Pro	Glu	Ile	Ala	Asn	Tyr	Gln	Thr	Pro	Ile	Lys	Asn	Leu	Tyr	Leu	Thr	
			500				505					510					
40	ggg	gcg	ggt	acc	cat	ccc	ggt	ggc	tcc	ata	tca	ggt	atg	ccc	ggt	aga	1584
	Gly	Ala	Gly	Thr	His	Pro	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Gly	Met	Pro	Gly	Arg	
			515				520					525					
45	aat	tgc	gct	cgg	gtc	ttt	tta	aaa	caa	caa	cgt	cgt	ttt	tgg	taa		1629
	Asn	Cys	Ala	Arg	Val	Phe	Leu	Lys	Gln	Gln	Arg	Arg	Phe	Trp			
		530				535					540						

&lt;210&gt; 12



&lt;211&gt; 542

&lt;212&gt; PRT

5 &lt;213&gt; Synechococystis

&lt;400&gt; 12

10

Met Ile Thr Thr Asp Val Val Ile Ile Gly Ala Gly His Asn Gly Leu  
 1 5 10 15

15 Val Cys Ala Ala Tyr Leu Leu Gln Arg Gly Leu Gly Val Thr Leu Leu  
 20 25 30

20 Glu Lys Arg Glu Val Pro Gly Gly Ala Ala Thr Thr Glu Ala Leu Met  
 35 40 45

25 Pro Glu Leu Ser Pro Gln Phe Arg Phe Asn Arg Cys Ala Ile Asp His  
 50 55 60

Glu Phe Ile Phe Leu Gly Pro Val Leu Gln Glu Leu Asn Leu Ala Gln  
 65 70 75 80

30 Tyr Gly Leu Glu Tyr Leu Phe Cys Asp Pro Ser Val Phe Cys Pro Gly  
 85 90 95

35 Leu Asp Gly Gln Ala Phe Met Ser Tyr Arg Ser Leu Glu Lys Thr Cys  
 100 105 110

40 Ala His Ile Ala Thr Tyr Ser Pro Arg Asp Ala Glu Lys Tyr Arg Gln  
 115 120 125

45 Phe Val Asn Tyr Trp Thr Asp Leu Leu Asn Ala Val Gln Pro Ala Phe  
 130 135 140

Asn Ala Pro Pro Gln Ala Leu Leu Asp Leu Ala Leu Asn Tyr Gly Trp  
 145 150 155 160

50

25

Glu Asn Leu Lys Ser Val Leu Ala Ile Ala Gly Ser Lys Thr Lys Ala  
165 170 175

5 Leu Asp Phe Ile Arg Thr Met Ile Gly Ser Pro Glu Asp Val Leu Asn  
180 185 190

10 Glu Trp Phe Asp Ser Glu Arg Val Lys Ala Pro Leu Ala Arg Leu Cys  
195 200 205

15 Ser Glu Ile Gly Ala Pro Pro Ser Gln Lys Gly Ser Ser Ser Gly Met  
210 215 220

Met Met Val Ala Met Arg His Leu Glu Gly Ile Ala Arg Pro Lys Gly  
225 230 235 240

20 Gly Thr Gly Ala Leu Thr Glu Ala Leu Val Lys Leu Val Gln Ala Gln  
245 250 255

25 Gly Gly Lys Ile Leu Thr Asp Gln Thr Val Lys Arg Val Leu Val Glu  
260 265 270

30 Asn Asn Gln Ala Ile Gly Val Glu Val Ala Asn Gly Glu Gln Tyr Arg  
275 280 285

35 Ala Lys Lys Gly Val Ile Ser Asn Ile Asp Ala Arg Arg Leu Phe Leu  
290 295 300

Gln Leu Val Glu Pro Gly Ala Leu Ala Lys Val Asn Gln Asn Leu Gly  
305 310 315 320

40 Glu Arg Leu Glu Arg Arg Thr Val Asn Asn Asn Glu Ala Ile Leu Lys  
325 330 335

45 Ile Asp Cys Ala Leu Ser Gly Leu Pro His Phe Thr Ala Met Ala Gly  
340 345 350

50 Pro Glu Asp Leu Thr Gly Thr Ile Leu Ile Ala Asp Ser Val Arg His  
355 360 365

Val Glu Glu Ala His Ala Leu Ile Ala Leu Gly Gln Ile Pro Asp Ala  
 370 375 380  
 5

Asn Pro Ser Leu Tyr Leu Asp Ile Pro Thr Val Leu Asp Pro Thr Met  
 385 390 395 400

10  
 Ala Pro Pro Gly Gln His Thr Leu Trp Ile Glu Phe Phe Ala Pro Tyr  
 405 410 415

15 Arg Ile Ala Gly Leu Glu Gly Thr Gly Leu Met Gly Thr Gly Trp Thr  
 420 425 430

20 Asp Glu Leu Lys Glu Lys Val Ala Asp Arg Val Ile Asp Lys Leu Thr  
 435 440 445

25 Asp Tyr Ala Pro Asn Leu Lys Ser Leu Ile Ile Gly Arg Arg Val Glu  
 450 455 460

Ser Pro Ala Glu Leu Ala Gln Arg Leu Gly Ser Tyr Asn Gly Asn Val  
 465 470 475 480

30 Tyr His Leu Asp Met Ser Leu Asp Gln Met Met Phe Leu Arg Pro Leu  
 485 490 495

35 Pro Glu Ile Ala Asn Tyr Gln Thr Pro Ile Lys Asn Leu Tyr Leu Thr  
 500 505 510

40 Gly Ala Gly Thr His Pro Gly Gly Ser Ile Ser Gly Met Pro Gly Arg  
 515 520 525

45 Asn Cys Ala Arg Val Phe Leu Lys Gln Gln Arg Arg Phe Trp  
 530 535 540

<210> 13

<211> 776

50

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Bradyrhizobium sp.

5

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

10

&lt;222&gt; (1)..(774)

&lt;223&gt;

15

&lt;400&gt; 13

atg cat gca gca acc gcc aag gct act gag ttc ggg gcc tct cgg cgc 48  
 Met His Ala Ala Thr Ala Lys Ala Thr Glu Phe Gly Ala Ser Arg Arg

20

1 5 10 15  
 gac gat gcg agg cag cgc cgc gtc ggt ctc acg ctg gcc gcg gtc atc 96  
 Asp Asp Ala Arg Gln Arg Arg Val Gly Leu Thr Leu Ala Ala Val Ile  
 20 25 30

25

atc gcc gcc tgg ctg gtg ctg cat gtc ggt ctg atg ttc ttc tgg ccg 144  
 Ile Ala Ala Trp Leu Val Leu His Val Gly Leu Met Phe Phe Trp Pro  
 35 40 45

30

ctg acc ctt cac agc ctg ctg ccg gct ttg cct ctg gtg gtg ctg cag 192  
 Leu Thr Leu His Ser Leu Leu Pro Ala Leu Pro Leu Val Val Leu Gln  
 50 55 60

35

acc tgg ctc tat gta ggc ctg ttc atc atc gcg cat gac tgc atg cac 240  
 Thr Trp Leu Tyr Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala His Asp Cys Met His  
 65 70 75 80

40

ggc tcg ctg gtg ccg ttc aag ccg cag gtc aac cgc cgt atc gga cag 288  
 Gly Ser Leu Val Pro Phe Lys Pro Gln Val Asn Arg Arg Ile Gly Gln  
 85 90 95

45

ctc tgc ctg ttc ctc tat gcc ggg ttc tcc ttc gac gct ctc aat gtc 336  
 Leu Cys Leu Phe Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Phe Asp Ala Leu Asn Val  
 100 105 110

gag cac cac aag cat cac cgc cat ccc gcc acg gcc gag gat ccc gat 384  
 Glu His His Lys His His Arg His Pro Gly Thr Ala Glu Asp Pro Asp  
 115 120 125

50

ttc gac gag gtg ccg ccg cac ggc ttc tgg cac tgg ttc gcc agc ttt 432

28

	Phe Asp Glu Val Pro Pro His Gly Phe Trp His Trp Phe Ala Ser Phe	
	130 135 140	
5	ttc ctg cac tat ttc ggc tgg aag cag gtc gcg atc atc gca gcc gtc Phe Leu His Tyr Phe Gly Trp Lys Gln Val Ala Ile Ile Ala Ala Val	480
	145 150 155 160	
10	tcg ctg gtt tat cag ctc gtc ttc gcc gtt ccc ttg cag aac atc ctg Ser Leu Val Tyr Gln Leu Val Phe Ala Val Pro Leu Gln Asn Ile Leu	528
	165 170 175	
15	ctg ttc tgg gcg ctg ccc ggg ctg ctg tcg gcg ctg cag ctg ttc acc Leu Phe Trp Ala Leu Pro Gly Leu Leu Ser Ala Leu Gln Leu Phe Thr	576
	180 185 190	
20	ttc ggc acc tat ctg ccg cac aag ccg gcc acg cag ccc ttc gcc gat Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Ala Thr Gln Pro Phe Ala Asp	624
	195 200 205	
25	cgc cac aac gcg cgg acg agc gaa ttt ccc gcg tgg ctg tcg ctg ctg Arg His Asn Ala Arg Thr Ser Glu Phe Pro Ala Trp Leu Ser Leu Leu	672
	210 215 220	
30	acc tgc ttc cac ttc ggc ttt cat cac gag cat cat ctg cat ccc gat Thr Cys Phe His Phe Gly Phe His His Glu His His Leu His Pro Asp	720
	225 230 235 240	
35	gcg ccg tgg tgg cgg ctg ccg gag atc aag cgg cgg gcc ctg gaa agg Ala Pro Trp Trp Arg Leu Pro Glu Ile Lys Arg Arg Ala Leu Glu Arg	768
	245 250 255	
40	cgt gac ta Arg Asp	776
45	<210> 14 <211> 258 <212> PRT <213> Bradyrhizobium sp.	
50	Met His Ala Ala Thr Ala Lys Ala Thr Glu Phe Gly Ala Ser Arg Arg 1 5 10 15	

Asp Asp Ala Arg Gln Arg Arg Val Gly Leu Thr Leu Ala Ala Val Ile  
 20 25 30  
 5  
 Ile Ala Ala Trp Leu Val Leu His Val Gly Leu Met Phe Phe Trp Pro  
 35 40 45  
 10  
 Leu Thr Leu His Ser Leu Leu Pro Ala Leu Pro Leu Val Val Leu Gln  
 50 55 60  
 15 Thr Trp Leu Tyr Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala His Asp Cys Met His  
 65 70 75 80  
 20 Gly Ser Leu Val Pro Phe Lys Pro Gln Val Asn Arg Arg Ile Gly Gln  
 85 90 95  
 Leu Cys Leu Phe Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Phe Asp Ala Leu Asn Val  
 100 105 110  
 25  
 Glu His His Lys His His Arg His Pro Gly Thr Ala Glu Asp Pro Asp  
 115 120 125  
 30  
 Phe Asp Glu Val Pro Pro His Gly Phe Trp His Trp Phe Ala Ser Phe  
 130 135 140  
 35 Phe Leu His Tyr Phe Gly Trp Lys Gln Val Ala Ile Ile Ala Ala Val  
 145 150 155 160  
 40 Ser Leu Val Tyr Gln Leu Val Phe Ala Val Pro Leu Gln Asn Ile Leu  
 165 170 175  
 Leu Phe Trp Ala Leu Pro Gly Leu Leu Ser Ala Leu Gln Leu Phe Thr  
 180 185 190  
 45  
 Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Ala Thr Gln Pro Phe Ala Asp  
 195 200 205  
 50

## 30

Arg His Asn Ala Arg Thr Ser Glu Phe Pro Ala Trp Leu Ser Leu Leu  
 210 215 220

5 Thr Cys Phe His Phe Gly Phe His His Glu His His Leu His Pro Asp  
 225 230 235 240

10 Ala Pro Trp Trp Arg Leu Pro Glu Ile Lys Arg Arg Ala Leu Glu Arg  
 245 250 255

Arg Asp

15

<210> 15

<211> 777

20

<212> DNA

<213> Nostoc sp.

25

<220>

<221> CDS

30

<222> (1) .. (777)

<223>

35

<400> 15

atg gtt cag tgt caa cca tca tct ctg cat tca gaa aaa ctg gtg tta 48  
 Met Val Gln Cys Gln Pro Ser Ser Leu His Ser Glu Lys Leu Val Leu  
 40 1 5 10 15

ttg tca tcg aca atc aga gat gat aaa aat att aat aag ggt ata ttt 96  
 Leu Ser Ser Thr Ile Arg Asp Asp Lys Asn Ile Asn Lys Gly Ile Phe  
 20 25 30

45

att gcc tgc ttt atc tta ttt tta tgg gca att agt tta atc tta tta 144  
 Ile Ala Cys Phe Ile Leu Phe Leu Trp Ala Ile Ser Leu Ile Leu Leu  
 35 40 45

50 ctc tca ata gat aca tcc ata att cat aag agc tta tta ggt ata gcc 192

## 31

	Leu Ser Ile Asp Thr Ser Ile Ile His Lys Ser Leu Leu Gly Ile Ala	
	50 55 60	
5	atg ctt tgg cag acc ttc tta tat aca ggt tta ttt att act gct cat Met Leu Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His	240
	65 70 75 80	
10	gat gcc atg cac ggc gta gtt tat ccc aaa aat ccc aga ata aat aat Asp Ala Met His Gly Val Val Tyr Pro Lys Asn Pro Arg Ile Asn Asn	288
	85 90 95	
15	ttt ata ggt aag ctc act cta atc ttg tat gga cta ctc cct tat aaa Phe Ile Gly Lys Leu Thr Leu Ile Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Lys	336
	100 105 110	
20	gat tta ttg aaa aaa cat tgg tta cac cac gga cat cct ggt act gat Asp Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His Gly His Pro Gly Thr Asp	384
	115 120 125	
25	tta gac cct gat tat tac aat ggt cat ccc caa aac ttc ttt ctt tgg Leu Asp Pro Asp Tyr Tyr Asn Gly His Pro Gln Asn Phe Phe Leu Trp	432
	130 135 140	
30	tat cta cat ttt atg aag tct tat tgg cga tgg acg caa att ttc gga Tyr Leu His Phe Met Lys Ser Tyr Trp Arg Trp Thr Gln Ile Phe Gly	480
	145 150 155 160	
35	tta gtg atg att ttt cat gga ctt aaa aat ctg gtg cat ata cca gaa Leu Val Met Ile Phe His Gly Leu Lys Asn Leu Val His Ile Pro Glu	528
	165 170 175	
40	aat aat tta att ata ttt tgg atg ata cct tct att tta agt tca gta Asn Asn Leu Ile Ile Phe Trp Met Ile Pro Ser Ile Leu Ser Ser Val	576
	180 185 190	
45	caa cta ttt tat ttt ggt aca ttt ttg cct cat aaa aag cta gaa ggt Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Lys Lys Leu Glu Gly	624
	195 200 205	
50	ggt tat act aac ccc cat tgt gcg cgc agt atc cca tta cct ctt ttt Gly Tyr Thr Asn Pro His Cys Ala Arg Ser Ile Pro Leu Pro Leu Phe	672
	210 215 220	
55	tgg tct ttt gtt act tgt tat cac ttc ggc tac cac aag gaa cat cac Trp Ser Phe Val Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Lys Glu His His	720
	225 230 235 240	
60	gaa tac cct caa ctt cct tgg tgg aaa tta cct gaa gct cac aaa ata Glu Tyr Pro Gln Leu Pro Trp Trp Lys Leu Pro Glu Ala His Lys Ile	768
	245 250 255	



tct tta taa  
Ser Leu

5

<210> 16

<211> 258

10

<212> PRT

<213> Nostoc sp.

15

<400> 16

20 Met Val Gln Cys Gln Pro Ser Ser Leu His Ser Glu Lys Leu Val Leu  
1 5 10 15

Leu Ser Ser Thr Ile Arg Asp Asp Lys Asn Ile Asn Lys Gly Ile Phe  
20 25 30

25

Ile Ala Cys Phe Ile Leu Phe Leu Trp Ala Ile Ser Leu Ile Leu Leu  
35 40 45

30

Leu Ser Ile Asp Thr Ser Ile Ile His Lys Ser Leu Leu Gly Ile Ala  
50 55 60

35 Met Leu Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His  
65 70 75 80

40 Asp Ala Met His Gly Val Val Tyr Pro Lys Asn Pro Arg Ile Asn Asn  
85 90 95

Phe Ile Gly Lys Leu Thr Leu Ile Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Lys  
100 105 110

45

Asp Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His Gly His Pro Gly Thr Asp  
115 120 125

50

## 33

Leu Asp Pro Asp Tyr Tyr Asn Gly His Pro Gln Asn Phe Phe Leu Trp  
 130 135 140

5 Tyr Leu His Phe Met Lys Ser Tyr Trp Arg Trp Thr Gln Ile Phe Gly  
 145 150 155 160

10 Leu Val Met Ile Phe His Gly Leu Lys Asn Leu Val His Ile Pro Glu  
 165 170 175

15 Asn Asn Leu Ile Ile Phe Trp Met Ile Pro Ser Ile Leu Ser Ser Val  
 180 185 190

Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Lys Lys Leu Glu Gly  
 195 200 205

20 Gly Tyr Thr Asn Pro His Cys Ala Arg Ser Ile Pro Leu Pro Leu Phe  
 210 215 220

25 Trp Ser Phe Val Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Lys Glu His His  
 225 230 235 240

30 Glu Tyr Pro Gln Leu Pro Trp Trp Lys Leu Pro Glu Ala His Lys Ile  
 245 250 255

Ser Leu

35

<210> 17

<211> 1608

40

<212> DNA

<213> Haematococcus pluvialis

45

<220>

<221> CDS

50

&lt;222&gt; (3)..(971)

&lt;223&gt;

5

&lt;400&gt; 17

	ct	aca	ttt	cac	aag	ccc	gtg	agc	ggg	gca	agc	gct	ctg	ccc	cac	atc	47
		Thr	Phe	His	Lys	Pro	Val	Ser	Gly	Ala	Ser	Ala	Leu	Pro	His	Ile	
10	1				5					10				15			
	ggc	cca	cct	cct	cat	ctc	cat	cgg	tca	ttt	gct	gct	acc	acg	atg	ctg	95
	Gly	Pro	Pro	Pro	His	Leu	His	Arg	Ser	Phe	Ala	Ala	Thr	Thr	Met	Leu	
					20					25				30			
15	tcg	aag	ctg	cag	tca	atc	agc	gtc	aag	gcc	cgc	cgc	gtt	gaa	cta	gcc	143
	Ser	Lys	Leu	Gln	Ser	Ile	Ser	Val	Lys	Ala	Arg	Arg	Val	Glu	Leu	Ala	
				35					40					45			
20	cgc	gac	atc	acg	cgg	ccc	aaa	gtc	tgc	ctg	cat	gct	cag	cgg	tgc	tcg	191
	Arg	Asp	Ile	Thr	Arg	Pro	Lys	Val	Cys	Leu	His	Ala	Gln	Arg	Cys	Ser	
				50				55					60				
	tta	gtt	cgg	ctg	cga	gtg	gca	gca	cca	cag	aca	gag	gag	gcg	ctg	gga	239
25	Leu	Val	Arg	Leu	Arg	Val	Ala	Ala	Pro	Gln	Thr	Glu	Glu	Ala	Leu	Gly	
		65				70				75							
	acc	gtg	cag	gct	gcc	ggc	gcg	ggc	gat	gag	cac	agc	gcc	gat	gta	gca	287
	Thr	Val	Gln	Ala	Ala	Gly	Ala	Gly	Asp	Glu	His	Ser	Ala	Asp	Val	Ala	
30	80				85				90				95				
	ctc	cag	cag	ctt	gac	cgg	gct	atc	gca	gag	cgt	cgt	gcc	cgg	cgc	aaa	335
	Leu	Gln	Gln	Leu	Asp	Arg	Ala	Ile	Ala	Glu	Arg	Arg	Ala	Arg	Arg	Lys	
				100					105				110				
35	cgg	gag	cag	ctg	tca	tac	cag	gct	gcc	gcc	att	gca	gca	tca	att	ggc	383
	Arg	Glu	Gln	Leu	Ser	Tyr	Gln	Ala	Ala	Ala	Ile	Ala	Ala	Ser	Ile	Gly	
				115				120					125				
40	gtg	tca	ggc	att	gcc	atc	ttc	gcc	acc	tac	ctg	aga	ttt	gcc	atg	cac	431
	Val	Ser	Gly	Ile	Ala	Ile	Phe	Ala	Thr	Tyr	Leu	Arg	Phe	Ala	Met	His	
				130				135					140				
	atg	acc	gtg	ggc	ggc	gca	gtg	cca	tgg	ggg	gaa	gtg	gct	ggc	act	ctc	479
45	Met	Thr	Val	Gly	Gly	Ala	Val	Pro	Trp	Gly	Glu	Val	Ala	Gly	Thr	Leu	
				145				150					155				
	ctc	ttg	gtg	gtt	ggg	ggc	gcg	ctc	ggc	atg	gag	atg	tat	gcc	cgc	tat	527
	Leu	Leu	Val	Val	Gly	Gly	Ala	Leu	Gly	Met	Glu	Met	Tyr	Ala	Arg	Tyr	
50	160				165				170				175				

	gca cac aaa gcc atc tgg cat gag tgg cct ctg ggc tgg ctg ctg cac	575
	Ala His Lys Ala Ile Trp His Glu Ser Pro Leu Gly Trp Leu Leu His	
	180 185 190	
5	aag agc cac cac aca cct cgc act gga ccc ttt gaa gcc aac gac ttg	623
	Lys Ser His His Thr Pro Arg Thr Gly Pro Phe Glu Ala Asn Asp Leu	
	195 200 205	
10	ttt gca atc atc aat gga ctg ccc gcc atg ctc ctg tgt acc ttt ggc	671
	Phe Ala Ile Ile Asn Gly Leu Pro Ala Met Leu Leu Cys Thr Phe Gly	
	210 215 220	
15	ttc tgg ctg ccc aac gtc ctg ggg gcg gcc tgc ttt gga gcg ggg ctg	719
	Phe Trp Leu Pro Asn Val Leu Gly Ala Ala Cys Phe Gly Ala Gly Leu	
	225 230 235	
20	ggc atc acg cta tac ggc atg gca tat atg ttt gta cac gat ggc ctg	767
	Gly Ile Thr Leu Tyr Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly Leu	
	240 245 250 255	
25	gtg cac agg cgc ttt ccc acc ggg ccc atc gct ggc ctg ccc tac atg	815
	Val His Arg Arg Phe Pro Thr Gly Pro Ile Ala Gly Leu Pro Tyr Met	
	260 265 270	
30	aag cgc ctg aca gtg gcc cac cag cta cac cac agc ggc aag tac ggt	863
	Lys Arg Leu Thr Val Ala His Gln Leu His His Ser Gly Lys Tyr Gly	
	275 280 285	
35	ggc gcg ccc tgg ggt atg ttc ttg ggt cca cag gag ctg cag cac att	911
	Gly Ala Pro Trp Gly Met Phe Leu Gly Pro Gln Glu Leu Gln His Ile	
	290 295 300	
40	cca ggt gcg gcg gag gag gtg gag cga ctg gtc ctg gaa ctg gac tgg	959
	Pro Gly Ala Ala Glu Glu Val Glu Arg Leu Val Leu Glu Leu Asp Trp	
	305 310 315	
45	tcc aag cgg tag ggtgcggaac caggcacgct ggtttcacac ctcatgctg	1011
	Ser Lys Arg	
	320	
50	tgataaggtg tggctagagc gatgcgtgtg agacgggtat gtcacggctg actggtctga	1071
	tggccaatgg catcgcccat gtctgggtcat cacgggctgg ttgcctgggt gaaggtgatg	1131
	cacatcatca tgtgcggttg gaggggctgg cacagtgtgg gctgaactgg agcagttgtc	1191
	caggctggcg ttgaatcagt gagggtttgt gattggcggt tgtgaagcaa tgactccgcc	1251
	catattctat ttgtgggagc tgagatgatg gcatgottgg gatgtgcatg gatcatggta	1311

gtgcagcaaa ctatattcac ctagggctgt tggtaggatc aggtgaggcc ttgcacattg 1371  
 catgatgtac tcgtcatggt gtgttggtga gaggatggat gtggatggat gtgtattctc 1431  
 5 agacgtagac cttgactgga ggcttgatcg agagagtggg ccgtattctt tgagagggga 1491  
 ggctcgtgcc agaaatggtg agtggatgac tgtgacgctg tacattgcag gcaggtgaga 1551  
 10 tgcactgtct cgattgtaaa atacattcag atgcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 1608

<210> 18

15 <211> 322

<212> PRT

<213> Haematococcus pluvialis

20

<400> 18

25 Thr Phe His Lys Pro Val Ser Gly Ala Ser Ala Leu Pro His Ile Gly  
 1 5 10 15

30 Pro Pro Pro His Leu His Arg Ser Phe Ala Ala Thr Thr Met Leu Ser  
 20 25 30

35 Lys Leu Gln Ser Ile Ser Val Lys Ala Arg Arg Val Glu Leu Ala Arg  
 35 40 45

Asp Ile Thr Arg Pro Lys Val Cys Leu His Ala Gln Arg Cys Ser Leu  
 50 55 60

40 Val Arg Leu Arg Val Ala Ala Pro Gln Thr Glu Glu Ala Leu Gly Thr  
 65 70 75 80

45 Val Gln Ala Ala Gly Ala Gly Asp Glu His Ser Ala Asp Val Ala Leu  
 85 90 95

50 Gln Gln Leu Asp Arg Ala Ile Ala Glu Arg Arg Ala Arg Arg Lys Arg  
 100 105 110

Glu Gln Leu Ser Tyr Gln Ala Ala Ala Ile Ala Ala Ser Ile Gly Val  
115 120 125

5

Ser Gly Ile Ala Ile Phe Ala Thr Tyr Leu Arg Phe Ala Met His Met  
130 135 140

10

Thr Val Gly Gly Ala Val Pro Trp Gly Glu Val Ala Gly Thr Leu Leu  
145 150 155 160

**15** Leu Val Val Gly Gly Ala Leu Gly Met Glu Met Tyr Ala Arg Tyr Ala  
                  165                         170                         175

20 His Lys Ala Ile Trp His Glu Ser Pro Leu Gly Trp Leu Leu His Lys  
180 185 190

Ser His His Thr Pro Arg Thr Gly Pro Phe Glu Ala Asn Asp Leu Phe  
195 200 205

25

Ala Ile Ile Asn Gly Leu Pro Ala Met Leu Leu Cys Thr Phe Gly Phe  
210 215 220

30

Trp Leu Pro Asn Val Leu Gly Ala Ala Cys Phe Gly Ala Gly Leu Gly  
225 230 235 240

35 Ile Thr Leu Tyr Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly Leu Val  
245 250 255

40 His Arg Arg Phe Pro Thr Gly Pro Ile Ala Gly Leu Pro Tyr Met Lys  
260 265 270

Arg Leu Thr Val Ala His Gln Leu His His Ser Gly Lys Tyr Gly Gly  
275 280 285

Ala Pro Trp Gly Met Phe Leu Gly Pro Gln Glu Leu Gln His Ile Pro  
290 295 300

50

Gly Ala Ala Glu Glu Val Glu Arg Leu Val Leu Glu Leu Asp Trp Ser  
 305 310 315 320

5 Lys Arg

<210> 19

10

<211> 1503

<212> DNA

15 <213> Tomate

<220>

20

<221> CDS

<222> (1)..(1503)

25 <223>

<400> 19

30

atg gat act ttg ttg aaa acc cca aat aac ctt gaa ttt ctg aac cca 48  
 Met Asp Thr Leu Leu Lys Thr Pro Asn Asn Leu Glu Phe Leu Asn Pro  
 1 5 10 15

cat cat ggt ttt gct gtt aaa gct agt acc ttt aga tct gag aag cat 96  
 His His Gly Phe Ala Val Lys Ala Ser Thr Phe Arg Ser Glu Lys His  
 20 25 30

35

cat aat ttt ggt tct agg aag ttt tgt gaa act ttg ggt aga agt gtt 144  
 His Asn Phe Gly Ser Arg Lys Phe Cys Glu Thr Leu Gly Arg Ser Val  
 35 40 45

40

tgt gtt aag ggt agt agt agt gct ctt tta gag ctt gta cct gag acc 192  
 Cys Val Lys Gly Ser Ser Ser Ala Leu Leu Glu Leu Val Pro Glu Thr  
 50 55 60

45

aaa aag gag aat ctt gat ttt gag ctt cct atg tat gac cct tca aaa 240  
 Lys Lys Glu Asn Leu Asp Phe Glu Leu Pro Met Tyr Asp Pro Ser Lys  
 65 70 75 80

50

ggg gtt gtt gtg gat ctt gct gtg gtt ggt ggt ggc cct gca gga ctt 288

## 39

	Gly Val Val Val Asp Leu Ala Val Val Gly Gly Gly Pro Ala Gly Leu	
	85 90 95	
5	gct gtt gca cag caa gtt tct gaa gca gga ctc tct gtt tgt tca att Ala Val Ala Gln Gln Val Ser Glu Ala Gly Leu Ser Val Cys Ser Ile	336
	100 105 110	
10	gat ccg aat cct aaa ttg ata tgg cct aat aac tat ggt gtt tgg gtg Asp Pro Asn Pro Lys Leu Ile Trp Pro Asn Asn Tyr Gly Val Trp Val	384
	115 120 125	
15	gat gaa ttt gag gct atg gac ttg tta gat tgt cta gat gct acc tgg Asp Glu Phe Glu Ala Met Asp Leu Leu Asp Cys Leu Asp Ala Thr Trp	432
	130 135 140	
	tct ggt gca gca gtg tac att gat gat aat acg gct aaa gat ctt cat Ser Gly Ala Ala Val Tyr Ile Asp Asp Asn Thr Ala Lys Asp Leu His	480
	145 150 155 160	
20	aga cct tat gga agg gtt aac cgg aaa cag ctg aaa tcg aaa atg atg Arg Pro Tyr Gly Arg Val Asn Arg Lys Gln Leu Lys Ser Lys Met Met	528
	165 170 175	
25	cag aaa tgt ata atg aat ggt gtt aaa ttc cac caa gcc aaa gtt ata Gln Lys Cys Ile Met Asn Gly Val Lys Phe His Gln Ala Lys Val Ile	576
	180 185 190	
30	aag gtg att cat gag gaa tcg aaa tcc atg ttg ata tgc aat gat ggt Lys Val Ile His Glu Glu Ser Lys Ser Met Leu Ile Cys Asn Asp Gly	624
	195 200 205	
35	att act att cag gca acg gtg gtg ctc gat gca act ggc ttc tct aga Ile Thr Ile Gln Ala Thr Val Val Leu Asp Ala Thr Gly Phe Ser Arg	672
	210 215 220	
	tct ctt gtt cag tat gat aag cct tat aac ccc ggg tat caa gtt gct Ser Leu Val Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Asn Pro Gly Tyr Gln Val Ala	720
	225 230 235 240	
40	tat ggc att ttg gct gaa gtg gaa gag cac ccc ttt gat gta aac aag Tyr Gly Ile Leu Ala Glu Val Glu Glu His Pro Phe Asp Val Asn Lys	768
	245 250 255	
45	atg gtt ttc atg gat tgg cga gat tct cat ttg aag aac aat act gat Met Val Phe Met Asp Trp Arg Asp Ser His Leu Lys Asn Asn Thr Asp	816
	260 265 270	
50	ctc aag gag aga aat agt aga ata cca act ttt ctt tat gca atg cca Leu Lys Glu Arg Asn Ser Arg Ile Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro	864
	275 280 285	



	ttt tca tcc aac agg ata ttt ctt gaa gaa aca tca ctc gta gct cgt Phe Ser Ser Asn Arg Ile Phe Leu Glu Glu Thr Ser Leu Val Ala Arg 290 295 300	912
5	cct ggc ttg cgt ata gat gat att caa gaa cga atg gtg gct cgt tta Pro Gly Leu Arg Ile Asp Asp Ile Gln Glu Arg Met Val Ala Arg Leu 305 310 315 320	960
10	aac cat ttg ggg ata aaa gtg aag agc att gaa gaa gat gaa cat tgt Asn His Leu Gly Ile Lys Val Lys Ser Ile Glu Glu Asp Glu His Cys 325 330 335	1008
15	cta ata cca atg ggt ggt cca ctt cca gta tta cct cag aga gtc gtt Leu Ile Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Val Leu Pro Gln Arg Val Val 340 345 350	1056
20	gga atc ggt ggt aca gct ggc atg gtt cat cca tcc acc ggt tat atg Gly Ile Gly Gly Thr Ala Gly Met Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met 355 360 365	1104
25	gtg gca agg aca cta gct gcg gct cct gtt gtt gcc aat gcc ata att Val Ala Arg Thr Leu Ala Ala Ala Pro Val Val Ala Asn Ala Ile Ile 370 375 380	1152
30	caa tac ctc ggt tct gaa aga agt cat tcg ggt aat gaa tta tcc aca Gln Tyr Leu Gly Ser Glu Arg Ser His Ser Gly Asn Glu Leu Ser Thr 385 390 395 400	1200
35	gct gtt tgg aaa gat ttg tgg cct ata gag agg aga cgt caa aga gag Ala Val Trp Lys Asp Leu Trp Pro Ile Glu Arg Arg Arg Gln Arg Glu 405 410 415	1248
40	ttc ttc tgc ttc ggt atg gat att ctt ctg aag ctt gat tta cct gct Phe Phe Cys Phe Gly Met Asp Ile Leu Leu Lys Leu Asp Leu Pro Ala 420 425 430	1296
45	aca aga agg ttc ttt gat gca ttc ttt gac tta gaa cct cgt tat tgg Thr Arg Arg Phe Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Glu Pro Arg Tyr Trp 435 440 445	1344
50	cat ggc ttc tta tcg tct cga ttg ttt cta cct gaa ctc ata gtt ttt His Gly Phe Leu Ser Ser Arg Leu Phe Leu Pro Glu Leu Ile Val Phe 450 455 460	1392
	ggg ctg tct cta ttc tct cat gct tca aat act tct aga ttt gag ata Gly Leu Ser Leu Phe Ser His Ala Ser Asn Thr Ser Arg Phe Glu Ile 465 470 475 480	1440
	atg aca aag gga act gtt cca tta gta aat atg atc aac aat ttg tta	1488

41

Met Thr Lys Gly Thr Val Pro Leu Val Asn Met Ile Asn Asn Leu Leu  
485 490 495

```

      cag gat aaa gaa tga
5      Gln Asp Lys Glu
                        500

```

1503

10	<210>	20
	<211>	500

<212> PRT

15 <213> Tomate

<400> 20

Met Asp Thr Leu Leu Lys Thr Pro Asn Asn Leu Glu Phe Leu Asn Pro  
1                5                      10                          15

25 ' His His Gly Phe Ala Val Lys Ala Ser Thr Phe Arg Ser Glu Lys His  
20 25 30

His Asn Phe Gly Ser Arg Lys Phe Cys Glu Thr Leu Gly Arg Ser Val  
30                    35                    40                    45

Cys Val Lys Gly Ser Ser Ser Ala Leu Leu Glu Leu Val Pro Glu Thr  
50 55 60

Lys Lys Glu Asn Leu Asp Phe Glu Leu Pro Met Tyr Asp Pro Ser Lys  
65 70 75 80

40 Gly Val Val Val Asp Leu Ala Val Val Gly Gly Gly Pro Ala Gly Leu  
85 90 95

45    Ala Val Ala Gln Gln Val Ser Glu Ala Gly Leu Ser Val Cys Ser Ile  
                100                    105                    110

Asp Pro Asn Pro Lys Leu Ile Trp Pro Asn Asn Tyr Gly Val Trp Val  
50               115                     120                         125

	Asp	Glu	Phe	Glu	Ala	Met	Asp	Leu	Leu	Asp	Cys	Leu	Asp	Ala	Thr	Trp	
	130						135					140					
5	Ser	Gly	Ala	Ala	Val	Tyr	Ile	Asp	Asp	Asn	Thr	Ala	Lys	Asp	Leu	His	
	145					150				155						160	
10	Arg	Pro	Tyr	Gly	Arg	Val	Asn	Arg	Lys	Gln	Leu	Lys	Ser	Lys	Met	Met	
					165					170					175		
15	Gln	Lys	Cys	Ile	Met	Asn	Gly	Val	Lys	Phe	His	Gln	Ala	Lys	Val	Ile	
				180					185					190			
20	Lys	Val	Ile	His	Glu	Glu	Ser	Lys	Ser	Met	Leu	Ile	Cys	Asn	Asp	Gly	
		195						200					205				
25	Ile	Thr	Ile	Gln	Ala	Thr	Val	Val	Leu	Asp	Ala	Thr	Gly	Phe	Ser	Arg	
	210						215					220					
30	Ser	Leu	Val	Gln	Tyr	Asp	Lys	Pro	Tyr	Asn	Pro	Gly	Tyr	Gln	Val	Ala	
	225					230					235					240	
35	Tyr	Gly	Ile	Leu	Ala	Glu	Val	Glu	Glu	His	Pro	Phe	Asp	Val	Asn	Lys	
				245						250					255		
40	Met	Val	Phe	Met	Asp	Trp	Arg	Asp	Ser	His	Leu	Lys	Asn	Asn	Thr	Asp	
				260					265					270			
45	Leu	Lys	Glu	Arg	Asn	Ser	Arg	Ile	Pro	Thr	Phe	Leu	Tyr	Ala	Met	Pro	
		275						280					285				
50	Phe	Ser	Ser	Asn	Arg	Ile	Phe	Leu	Glu	Glu	Thr	Ser	Leu	Val	Ala	Arg	
	290						295					300					
	Pro	Gly	Leu	Arg	Ile	Asp	Asp	Ile	Gln	Glu	Arg	Met	Val	Ala	Arg	Leu	
	305					310					315					320	

## 43

Asn His Leu Gly Ile Lys Val Lys Ser Ile Glu Glu Asp Glu His Cys  
 325 330 335

5 Leu Ile Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Val Leu Pro Gln Arg Val Val  
 340 345 350

10 Gly Ile Gly Gly Thr Ala Gly Met Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met  
 355 360 365

15 Val Ala Arg Thr Leu Ala Ala Ala Pro Val Val Ala Asn Ala Ile Ile  
 370 375 380

20 Gln Tyr Leu Gly Ser Glu Arg Ser His Ser Gly Asn Glu Leu Ser Thr  
 385 390 395 400

Ala Val Trp Lys Asp Leu Trp Pro Ile Glu Arg Arg Arg Gln Arg Glu  
 405 410 415

25 Phe Phe Cys Phe Gly Met Asp Ile Leu Leu Lys Leu Asp Leu Pro Ala  
 420 425 430

30 Thr Arg Arg Phe Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Glu Pro Arg Tyr Trp  
 435 440 445

35 His Gly Phe Leu Ser Ser Arg Leu Phe Leu Pro Glu Leu Ile Val Phe  
 450 455 460

Gly Leu Ser Leu Phe Ser His Ala Ser Asn Thr Ser Arg Phe Glu Ile  
 465 470 475 480

40 Met Thr Lys Gly Thr Val Pro Leu Val Asn Met Ile Asn Asn Leu Leu  
 485 490 495

45 Gln Asp Lys Glu  
 500

50 <210> 21

<211> 195

<212> DNA

5 <213> Kartoffel

<220>

10

<221> Intron

<222> (1)..(195)

15 <223>

<400> 21

20 tacgtaagtt tctgcttcta cctttgatat atatataata attatcatta attagtagta 60

atataatatt tcaaataattt ttttcaaaat aaaagaatgt agtatatagc aattgctttt 120

25 ctgtagttta taagtgtgta tattttaatt tataactttt ctaatatatg accaaaattt 180

gttgatgtgc agctg 195

<210> 22

30

<211> 1155

<212> DNA

35 <213> Haematococcus pluvialis

<220>

40

<221> CDS

<222> (6)..(995)

45 <223>

<400> 22

50 gaagc atg cag cta gca gcg aca gta atg ttg gag cag ctt acc gga agc 50

## 45

	Met	Gln	Leu	Ala	Ala	Thr	Val	Met	Leu	Glu	Gln	Leu	Thr	Gly	Ser	
	1			5						10					15	
5	gct gag gca ctc aag gag aag gag aag gag gtt gca ggc agc tct gac															98
	Ala Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp															
	20					25					30					
10	gtg ttg cgt aca tgg gcg acc cag tac tcg ctt ccg tca gag gag tca															146
	Val Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser															
	35					40					45					
15	gac gcg gcc cgc ccg gga ctg aag aat gcc tac aag cca cca cct tcc															194
	Asp Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser															
	50					55					60					
20	gac aca aag ggc atc aca atg gcg cta gct gtc atc ggc tcc tgg gcc															242
	Asp Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala															
	65					70					75					
25	gca gtg ttc ctc cac gcc att ttt caa atc aag ctt ccg acc tcc ttg															290
	Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu															
	80					85					90					95
30	gac cag ctg cac tgg ctg ccc gtg tca gat gcc aca gct cag ctg gtt															338
	Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val															
	100					105					110					
35	agc ggc agc agc agc ctg ctg cac atc gtc gta gta ttc ttt gtc ctg															386
	Ser Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu															
	115					120					125					
40	gag ttc ctg tac aca ggc ctt ttt atc acc acg cat gat gct atg cat															434
	Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His															
	130					135					140					
45	ggc acc atc gcc atg aga aac agg cag ctt aat gac ttc ttg ggc aga															482
	Gly Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg															
	145					150					155					
50	gta tgc atc tcc ttg tac gcc tgg ttt gat tac aac atg ctg cac cgc															530
	Val Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg															
	160					165					170					175
55	aag cat tgg gag cac cac aac cac act ggc gag gtg ggc aag gac cct															578
	Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro															
	180					185					190					
60	gac ttc cac agg gga aac cct ggc att gtg ccc tgg ttt gcc agc ttc															626
	Asp Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe															
	195					200					205					

atg tcc agc tac atg tcg atg tgg cag ttt gcg cgc ctc gca tgg tgg 674  
 Met Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp  
 210 215 220

5 acg gtg gtc atg cag ctg ctg ggt gcg cca atg gcg aac ctg ctg gtg 722  
 Thr Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val  
 225 230 235

10 ttc atg gcg gcc gcg ccc atc ctg tcc gcc ttc cgc ttg ttc tac ttt 770  
 Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe  
 240 245 250 255

15 ggc acg tac atg ccc cac aag cct gag cct ggc gcc gcg tca ggc tct 818  
 Gly Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser  
 260 265 270

20 tca cca gcc gtc atg aac tgg tgg aag tcg cgc act agc cag gcg tcc 866  
 Ser Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser  
 275 280 285

25 gac ctg gtc agc ttt ctg acc tgc tac cac ttc gac ctg cac tgg gag 914  
 Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu  
 290 295 300

cac cac cgc tgg ccc ttt gcc ccc tgg tgg gag ctg ccc aac tgc cgc 962  
 His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg  
 305 310 315

30 cgc ctg tct ggc cga ggt ctg gtt cct gcc tag ctggacacac tgcagtgggc 1015  
 Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala  
 320 325

35 cctgctgccca gctgggcatg caggttgtgg caggactggg tgaggtgaaa agctgcaggc 1075  
 gctgctgccg gacacgctgc atgggctacc ctgtgtagct gccgccacta ggggaaggggg 1135  
 tttgtagctg tcgagcttgc 1155

40 <210> 23  
 <211> 329

45 <212> PRT  
 <213> Haematococcus pluvialis

&lt;400&gt; 23

Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala  
 1 5 10 15

5

Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val  
 20 25 30

10

Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp  
 35 40 45

15

Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp  
 50 55 60

20

Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala  
 65 70 75 80

25

Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp  
 85 90 95

Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser  
 100 105 110

30

Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu  
 115 120 125

35

Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly  
 130 135 140

40

Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val  
 145 150 155 160

45

Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys  
 165 170 175

His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp  
 180 185 190

50



48

Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met  
195 200 205

5 Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr  
210 215 220

10 Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe  
225 230 235 240

15 Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly  
245 250 255

Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser  
260 265 270

20 Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp  
275 280 285

25 Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His  
290 295 300

30 His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg  
305 310 315 320

Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala  
325

35

<210> 24

<211> 1111

40

<212> DNA

<213> Haematococcus pluvialis

45

<220>

<221> CDS

50

<223>

5

<400> 24

10

tct gac gtg ttg cgt aca tgg gcg acc cag tac tcg ctt ccg tca gaa 96  
Ser Asp Val Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu  
20 25 30

15

gag tca gac gcg gcc cgc ccg gga ctg aag aat gcc tac aag cca cca 144  
Glu Ser Asp Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro  
35 40 45

20

cct tcc gac aca aag ggc atc aca atg gcg cta gct gtc atc ggc tcc 192  
Pro Ser Asp Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser  
50 55 60

25

tgg gcc gca gtg ttc ctc cac gcc att ttt caa atc aag ctt ccg acc      240  
Trp Ala Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr  
65                          70                          75

30

tcc ttg gac cag ctg cac tgg ctg ccc gtg tca gat gcc aca gct cag 288  
 Ser Leu Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln  
 80 85 90 95

35

ctg	gtt	agc	ggc	agc	agc	agc	ctg	ctg	cac	atc	gtc	gta	gta	ttc	ttt	336
Leu	Val	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Leu	Leu	His	Ile	Val	Val	Val	Phe	Phe	
			100						105					110		

gtc ctg gag ttc ctg tac aca ggc ctt ttt atc acc acg cat gat gct 384  
Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala  
115 120 125

40

atg cat ggc acc atc gcc atg aga aac agg cag ctt aat gac ttc ttg 432  
Met His Gly Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu  
130 135 140

45

ggc aga gta tgc atc tcc ttg tac gcc tgg ttt gat tac aac atg ctg 480  
Gly Arg Val Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu  
145 150 155

50

cac cgc aag cat tgg gag cac cac aac cac act ggc gag gtg ggc aag 528  
His Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys  
160 165 170 175

	gac cct gac ttc cac agg gga aac cct ggc att gtg ccc tgg ttt gcc	576
	Asp Pro Asp Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala	
	180 185 190	
5	agc ttc atg tcc agc tac atg tcg atg tgg cag ttt gcg cgc ctc gca	624
	Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala	
	195 200 205	
10	tgg tgg acg gtg gtc atg cag ctg ctg ggt gcg cca atg gcg aac ctg	672
	Trp Trp Thr Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu	
	210 215 220	
15	ctg gtg ttc atg gcg gcc gcg ccc atc ctg tcc gcc ttc cgc ttg ttc	720
	Leu Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe	
	225 230 235	
20	tac ttt ggc acg tac atg ccc cac aag cct gag cct ggc gcc gcg tca	768
	Tyr Phe Gly Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser	
	240 245 250 255	
25	ggc tct tca cca gcc gtc atg aac tgg tgg aag tcg cgc act agc cag	816
	Gly Ser Ser Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln	
	260 265 270	
30	gcg tcc gac ctg gtc agc ttt ctg acc tgc tac cac ttc gac ctg cac	864
	Ala Ser Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His	
	275 280 285	
35	tgg gag cac cac cgc tgg ccc ttc gcc ccc tgg tgg gag ctg ccc aac	912
	Trp Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn	
	290 295 300	
40	tgc cgc cgc ctg tct ggc cga ggt ctg gtt cct gcc tag ctggacacac	961
	Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala	
	305 310 315	
	tgacagtgggc cctgctgcca gctgggcatg caggttggtg caggactggg tgaggtgaaa	1021
	agctgcaggg gctgctgccg gacacgttgc atgggctacc ctgtgtagct gccgccacta	1081
	ggggagggggg tttgtagctg tcgagcttgc	1111
45	<210> 25	
	<211> 315	
	<212> PRT	
50		

&lt;213&gt; Haematococcus pluvialis

5 &lt;400&gt; 25

Met Leu Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser  
 1 5 10 15

10

Asp Val Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu  
 20 25 30

15

Ser Asp Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro  
 35 40 45

20

Ser Asp Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp  
 50 55 60

25

Ala Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser  
 65 70 75 80

Leu Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu  
 85 90 95

30

Val Ser Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val  
 100 105 110

35

Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met  
 115 120 125

40

His Gly Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly  
 130 135 140

45

Arg Val Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His  
 145 150 155 160

Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp  
 165 170 175

50

## 52

Pro Asp Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser  
 180 185 190

5 Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp  
 195 200 205

10 Trp Thr Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu  
 210 215 220

15 Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr  
 225 230 235 240

Phe Gly Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly  
 245 250 255

20 Ser Ser Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala  
 260 265 270

25 Ser Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp  
 275 280 285

30 Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys  
 290 295 300

35 Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala  
 305 310 315

<210> 26

<211> 1031

<212> DNA

<213> Haematococcus pluvialis

<220>

<221> CDS

50

&lt;222&gt; (6)..(1031)

&lt;223&gt;

5

&lt;400&gt; 26

	gaagc atg cag cta gca gcg aca gta atg ttg gag cag ctt acc gga agc	50
	Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser	
10	1 5 10 15	
	gct gag gca ctc aag gag aag gag aag gag gtt gca ggc agc tct gac	98
	Ala Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp	
	20 25 30	
15	gtg ttg cgt aca tgg gcg acc cag tac tcg ctt ccg tca gag gag tca	146
	Val Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser	
	35 40 45	
20	gac gcg gcc cgc ccg gga ctg aag aat gcc tac aag cca cca cct tcc	194
	Asp Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser	
	50 55 60	
	gac aca aag ggc atc aca atg gcg cta gct gtc atc ggc tcc tgg gct	242
25	Asp Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala	
	65 70 75	
	gca gtg ttc ctc cac gcc att ttt caa atc aag ctt ccg acc tcc ttg	290
	Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu	
30	80 85 90 95	
	gac cag ctg cac tgg ctg ccc gtg tca gat gcc aca gct cag ctg gtt	338
	Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val	
	100 105 110	
35	agc ggc agc agc agc ctg ctg cac atc gtc gta gta ttc ttt gtc ctg	386
	Ser Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu	
	115 120 125	
40	gag ttc ctg tac aca ggc ctt ttt atc acc acg cat gat gct atg cat	434
	Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His	
	130 135 140	
	ggc acc atc gcc atg aga aac agg cag ctt aat gac ttc ttg ggc aga	482
45	Gly Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg	
	145 150 155	
	gta tgc atc tcc ttg tac gcc tgg ttt gat tac aac atg ctg cac cgc	530
	Val Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg	
50	160 165 170 175	

aag cat tgg gag cac cac aac cac act ggc gag gtg ggc aag gac cct 578  
 Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro  
 180 185 190

5 gac ttc cac agg gga aac cct ggc att gtg ccc tgg ttt gcc agc ttc 626  
 Asp Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe  
 195 200 205

10 atg tcc agc tac atg tgc atg tgg cag ttt gcg cgc ctc gca tgg tgg 674  
 Met Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp  
 210 215 220

15 acg gtg gtc atg cag ctg ctg ggt gcg cca atg gcg aac ctg ctg gtg 722  
 Thr Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val  
 225 230 235

20 ttc atg gcg gcc gcg ccc atc ctg tcc gcc ttc cgc ttg ttc tac ttt 770  
 Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe  
 240 245 250 255

25 ggc acg tac atg ccc cac aag cct gag cct ggc gcc gcg tca ggc tct 818  
 Gly Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser  
 260 265 270

tca cca gcc gtc atg aac tgg tgg aag tgc cgc act agc cag gcg tcc 866  
 Ser Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser  
 275 280 285

30 gac ctg gtc agc ttt ctg acc tgc tac cac ttc gac ctg cac tgg gag 914  
 Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu  
 290 295 300

35 cac cac cgc tgg ccc ttt gcc ccc tgg tgg gag ctg ccc aac tgc cgc 962  
 His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg  
 305 310 315

40 cgc ctg tct ggc cga ggt ctg gtt cct gcc gag caa aaa ctc atc tca 1010  
 Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser  
 320 325 330 335

gaa gag gat ctg aat agc tag 1031  
 Glu Glu Asp Leu Asn Ser  
 340

45 <210> 27  
 <211> 341  
 50

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Haematococcus pluvialis

5

&lt;400&gt; 27

Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala  
 10 1 5 10 15

Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val  
 15 20 25 30

Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp  
 35 40 45

Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp  
 50 55 60

Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala  
 65 70 75 80

Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp  
 85 90 95

Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser  
 100 105 110

Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu  
 115 120 125

Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly  
 130 135 140

Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val  
 145 150 155 160

Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys  
 165 170 175



His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp  
 180 185 190

5

Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met  
 195 200 205

10

Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr  
 210 215 220

15

Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe  
 225 230 235 240

20

Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly  
 245 250 255

25

Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser  
 260 265 270

Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp  
 275 280 285

30

Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His  
 290 295 300

35

His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg  
 305 310 315 320

40

Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu  
 325 330 335

Glu Asp Leu Asn Ser  
 340

45

<210> 28

<211> 777

50

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

5

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; promoter

10

&lt;222&gt; (1) .. (777)

&lt;223&gt;

15

&lt;400&gt; 28

gagctcactc actgatttcc attgcttgaa aattgatgat gaactaagat caatccatgt 60

20

tagtttcaaa acaacagtaa ctgtggccaa cttagttttg aaacaacact aactggtcga 120

agcaaaaaga aaaaagagtt tcatcatata tctgatttga tggactgttt ggagttagga 180

ccaaacatta tctacaaaca aagacttttc tcctaacttg tgattccttc ttaaacccta 240

25

ggggtaatat tctatttttc aaggatcttt agttaaggc aaatccggga aattattgta 300

atcatttggg gaaacatata aaagatttga gttagatgga agtgacgatt aatccaaaca 360

30

tatatatctc tttctttotta tttcccaaata taacagacaa aagtagaata ttggctttta 420

acaccaatat aaaaacttgc ttcacaccta aacacttttg tttacttttag ggtaagtgca 480

aaaagccaac caaatccacc tgcactgatt tgacgtttac aaacgccggt aagtcgatgt 540

35

ccgttgatgt aaacagtgtc ttgtaattaa aaaaatcagt ttacataaat ggaaaattta 600

tcacttagtt ttcatcaact tctgaactta cctttcatgg attaggcaat actttccatt 660

40

tttagtaact caagtggaacc ctttacttct tcaactccat ctctctcttt ctatttcact 720

tctttcttct cattatatct cttgtcctct ccaccaaata tcttcaacaa aaagctt 777

45

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

50

<213> kuenstlich

5 <220>

<221> primer\_bind

<222> (1) .. (22)

10

<223>

15

<400> 29

gcaagctcga cagctacaaa cc

22

<210> 30

20

<211> 24

<212> DNA

25

<213> kuenstlich

<220>

30

<221> primer\_bind

<222> (1) .. (24)

35

<223>

<400> 30

40

gaagcatgca gctagcagcg acag

24

<210> 31

45

<211> 30

<212> DNA

<213> kuenstlich

50

&lt;220&gt;

5 &lt;221&gt; primer\_bind

&lt;222&gt; (1) .. (30)

&lt;223&gt;

10

<400> 31  
tgcattgctag aggcactcaa ggagaaggag

30

15

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 59

20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; kuenstlich

25

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; primer\_bind

30

&lt;222&gt; (1) .. (59)

&lt;223&gt;

35

<400> 32  
ctagctattc agatcctctt ctgagatgag tttttgctcg gcaggaacca gacctcggc

59

40

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 28

45 &lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; kuenstlich

50

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; primer\_bind

5 &lt;222&gt; (1)..(28)

&lt;223&gt;

10

&lt;400&gt; 33

gagctcactc actgatttcc attgcttg

28

15 &lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 37

&lt;212&gt; DNA

20

&lt;213&gt; kuenstlich

25 &lt;220&gt;

&lt;221&gt; primer\_bind

&lt;222&gt; (1)..(37)

30

&lt;223&gt;

35 &lt;400&gt; 34

cgccgttaag tcgatgtccg ttgatttaaa cagtgtc

37

&lt;210&gt; 35

40

&lt;211&gt; 34

&lt;212&gt; DNA

45 &lt;213&gt; kuenstlich

&lt;220&gt;

50

<221> primer\_bind  
<222> (1)..(34)  
5 <223>  
  
<400> 35  
10 atcaacggac atcgacttaa cggcgtttgt aaac 34  
  
<210> 36  
15 <211> 25  
<212> DNA  
<213> kuenstlich  
20  
  
<220>  
25 <221> primer\_bind  
<222> (1)..(25)  
<223>  
30  
  
<400> 36  
35 taagcttttt gttgaagaga tttgg 25  
  
<210> 37  
  
<211> 212  
40 <212> DNA  
<213> Kuenstliche Sequenz  
  
45  
  
<220>  
  
<221> Intron  
50

&lt;222&gt; (1)..(212)

&lt;223&gt;

5

&lt;400&gt; 37

gtcgactacg taagtttctg cttctacctt tgatatatat ataataatta tcattaatta 60

10

gtagtaatat aatatttcaa atattttttt caaaataaaa gaatgtagta tatagcaatt 120

gcttttctgt agtttataag tgtgtatatt ttaatttata actttttctaa tatatgacca 180

aaatttggtg atgtgcaggt atcacggat cc 212

15

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 1830

20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Tagetes erecta

25

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

30

&lt;222&gt; (141)..(1691)

&lt;223&gt;

35

&lt;400&gt; 38

ggcacgaggc aaagcaaagg ttgtttggtg ttgttggtga gagacactcc aatccaaaca 60

40

gatacaaggc gtgactggat atttctctct cgttcctaac aacagcaacg aagaagaaaa 120

agaatcatta ctaacaatca atg agt atg aga gct gga cac atg acg gca aca 173

Met Ser Met Arg Ala Gly His Met Thr Ala Thr

1

5

10

45

atg gcg gct ttt aca tgc cct agg ttt atg act agc atc aga tac acg 221

Met Ala Ala Phe Thr Cys Pro Arg Phe Met Thr Ser Ile Arg Tyr Thr

15

20

25

50

aag caa att aag tgc aac gct gct aaa agc cag cta gtc gtt aaa caa 269

## 63

	Lys	Gln	Ile	Lys	Cys	Asn	Ala	Ala	Lys	Ser	Gln	Leu	Val	Val	Lys	Gln	
	30						35					40					
5	gag	att	gag	gag	gaa	gaa	gat	tat	gtg	aaa	gcc	ggg	gga	tcg	gag	ctg	317
	Glu	Ile	Glu	Glu	Glu	Glu	Asp	Tyr	Val	Lys	Ala	Gly	Gly	Ser	Glu	Leu	
	45						50				55						
10	ctt	ttt	gtt	caa	atg	caa	cag	aat	aag	tcc	atg	gat	gca	cag	tct	agc	365
	Leu	Phe	Val	Gln	Met	Gln	Gln	Asn	Lys	Ser	Met	Asp	Ala	Gln	Ser	Ser	
	60					65				70					75		
15	cta	tcc	caa	aag	ctc	cca	agg	gta	cca	ata	gga	gga	gga	gga	gac	agt	413
	Leu	Ser	Gln	Lys	Leu	Pro	Arg	Val	Pro	Ile	Gly	Gly	Gly	Gly	Asp	Ser	
					80					85					90		
	aac	tgt	ata	ctg	gat	ttg	gtt	gta	att	ggg	tgt	ggg	cct	gct	ggc	ctt	461
	Asn	Cys	Ile	Leu	Asp	Leu	Val	Val	Ile	Gly	Cys	Gly	Pro	Ala	Gly	Leu	
				95					100					105			
20	gct	ctt	gct	gga	gaa	tca	gcc	aag	cta	ggc	ttg	aat	gtc	gca	ctt	atc	509
	Ala	Leu	Ala	Gly	Glu	Ser	Ala	Lys	Leu	Gly	Leu	Asn	Val	Ala	Leu	Ile	
		110					115						120				
25	ggc	cct	gat	ctt	cct	ttt	aca	aat	aac	tat	ggg	gtt	tgg	gag	gat	gaa	557
	Gly	Pro	Asp	Leu	Pro	Phe	Thr	Asn	Asn	Tyr	Gly	Val	Trp	Glu	Asp	Glu	
		125					130					135					
30	ttt	ata	ggg	ctt	gga	ctt	gag	ggc	tgt	att	gaa	cat	gtt	tgg	cga	gat	605
	Phe	Ile	Gly	Leu	Gly	Leu	Glu	Gly	Cys	Ile	Glu	His	Val	Trp	Arg	Asp	
	140					145				150					155		
35	act	gta	gta	tat	ctt	gat	gac	aac	gat	ccc	att	ctc	ata	ggg	cgt	gcc	653
	Thr	Val	Val	Tyr	Leu	Asp	Asp	Asn	Asp	Pro	Ile	Leu	Ile	Gly	Arg	Ala	
					160					165					170		
	tat	gga	cga	gtt	agt	cgt	gat	tta	ctt	cac	gag	gag	ttg	ttg	act	agg	701
	Tyr	Gly	Arg	Val	Ser	Arg	Asp	Leu	Leu	His	Glu	Glu	Leu	Leu	Thr	Arg	
				175				180					185				
40	tgc	atg	gag	tca	ggc	gtt	tca	tat	ctg	agc	tcc	aaa	gtg	gaa	cgg	att	749
	Cys	Met	Glu	Ser	Gly	Val	Ser	Tyr	Leu	Ser	Ser	Lys	Val	Glu	Arg	Ile	
			190					195				200					
45	act	gaa	gct	cca	aat	ggc	cta	agt	ctc	ata	gag	tgt	gaa	ggc	aat	atc	797
	Thr	Glu	Ala	Pro	Asn	Gly	Leu	Ser	Leu	Ile	Glu	Cys	Glu	Gly	Asn	Ile	
		205					210					215					
50	aca	att	cca	tgc	agg	ctt	gct	act	gtc	gct	tct	gga	gca	gct	tct	gga	845
	Thr	Ile	Pro	Cys	Arg	Leu	Ala	Thr	Val	Ala	Ser	Gly	Ala	Ala	Ser	Gly	
	220					225				230					235		



	aaa ctt ttg cag tat gaa ctt ggc ggt ccc cgt gtt tgc gtt caa aca	893
	Lys Leu Leu Gln Tyr Glu Leu Gly Gly Pro Arg Val Cys Val Gln Thr	
	240 245 250	
5	gct tat ggt ata gag gtt gag gtt gaa agc ata ccc tat gat cca agc	941
	Ala Tyr Gly Ile Glu Val Glu Val Glu Ser Ile Pro Tyr Asp Pro Ser	
	255 260 265	
10	cta atg gtt ttc atg gat tat aga gac tac acc aaa cat aaa tct caa	989
	Leu Met Val Phe Met Asp Tyr Arg Asp Tyr Thr Lys His Lys Ser Gln	
	270 275 280	
15	tca cta gaa gca caa tat cca aca ttt ttg tat gtc atg cca atg tct	1037
	Ser Leu Glu Ala Gln Tyr Pro Thr Phe Leu Tyr Val Met Pro Met Ser	
	285 290 295	
20	cca act aaa gta ttc ttt gag gaa act tgt ttg gct tca aaa gag gcc	1085
	Pro Thr Lys Val Phe Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala Ser Lys Glu Ala	
	300 305 310 315	
	atg cct ttt gag tta ttg aag aca aaa ctc atg tca aga tta aag act	1133
	Met Pro Phe Glu Leu Leu Lys Thr Lys Leu Met Ser Arg Leu Lys Thr	
	320 325 330	
25	atg ggg atc cga ata acc aaa act tat gaa gag gaa tgg tca tat att	1181
	Met Gly Ile Arg Ile Thr Lys Thr Tyr Glu Glu Glu Trp Ser Tyr Ile	
	335 340 345	
30	cca gta ggt gga tcc tta cca aat acc gag caa aag aac ctt gca ttt	1229
	Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro Asn Thr Glu Gln Lys Asn Leu Ala Phe	
	350 355 360	
35	ggg gct gct gct agc atg gtg cat cca gcc aca gga tat tcg gtt gta	1277
	Gly Ala Ala Ala Ser Met Val His Pro Ala Thr Gly Tyr Ser Val Val	
	365 370 375	
	aga tca ctg tca gaa gct cct aat tat gca gca gta att gca aag att	1325
	Arg Ser Leu Ser Glu Ala Pro Asn Tyr Ala Ala Val Ile Ala Lys Ile	
40	380 385 390 395	
	tta ggg aaa gga aat tca aaa cag atg ctt gat cat gga aga tac aca	1373
	Leu Gly Lys Gly Asn Ser Lys Gln Met Leu Asp His Gly Arg Tyr Thr	
	400 405 410	
45	acc aac atc tca aag caa gct tgg gaa aca ctt tgg ccc ctt gaa agg	1421
	Thr Asn Ile Ser Lys Gln Ala Trp Glu Thr Leu Trp Pro Leu Glu Arg	
	415 420 425	
50	aaa aga cag aga gca ttc ttt ctc ttt gga tta gca ctg att gtc cag	1469

## 65

Lys Arg Gln Arg Ala Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ala Leu Ile Val Gln  
 430 435 440

5 atg gat att gag ggg acc cgc aca ttc ttc cgg act ttc ttc cgc ttg 1517  
 Met Asp Ile Glu Gly Thr Arg Thr Phe Phe Arg Thr Phe Phe Arg Leu  
 445 450 455

10 ccc aca tgg atg tgg tgg ggg ttt ctt gga tct tcg tta tca tca act 1565  
 Pro Thr Trp Met Trp Trp Gly Phe Leu Gly Ser Ser Leu Ser Ser Thr  
 460 465 470 475

15 gac ttg ata ata ttt gcg ttt tac atg ttt atc ata gca ccg cat agc 1613  
 Asp Leu Ile Ile Phe Ala Phe Tyr Met Phe Ile Ile Ala Pro His Ser  
 480 485 490

ctg aga atg ggt ctg gtt aga cat ttg ctt tct gac ccg aca gga gga 1661  
 Leu Arg Met Gly Leu Val Arg His Leu Leu Ser Asp Pro Thr Gly Gly  
 495 500 505

20 aca atg tta aaa gcg tat ctc acg ata taa ataactctag tcgcatcag 1711  
 Thr Met Leu Lys Ala Tyr Leu Thr Ile  
 510 515

25 tttagattat aggcacatct tgcatatata tatgtataaa ccttatgtgt gctgtatcct 1771  
 tacatcaaca cagtcattaa ttgtatttct tggggtaatg ctgatgaagt attttctgg 1830

30 <210> 39  
 <211> 516  
 <212> PRT

35 <213> Tagetes erecta

40 <400> 39  
 Met Ser Met Arg Ala Gly His Met Thr Ala Thr Met Ala Ala Phe Thr  
 1 5 10 15

45 Cys Pro Arg Phe Met Thr Ser Ile Arg Tyr Thr Lys Gln Ile Lys Cys  
 20 25 30

50 Asn Ala Ala Lys Ser Gln Leu Val Val Lys Gln Glu Ile Glu Glu Glu  
 35 40 45

	Glu	Asp	Tyr	Val	Lys	Ala	Gly	Gly	Ser	Glu	Leu	Leu	Phe	Val	Gln	Met	
	50						55				60						
5																	
	Gln	Gln	Asn	Lys	Ser	Met	Asp	Ala	Gln	Ser	Ser	Leu	Ser	Gln	Lys	Leu	
	65					70				75						80	
10																	
	Pro	Arg	Val	Pro	Ile	Gly	Gly	Gly	Gly	Asp	Ser	Asn	Cys	Ile	Leu	Asp	
					85					90					95		
15																	
	Leu	Val	Val	Ile	Gly	Cys	Gly	Pro	Ala	Gly	Leu	Ala	Leu	Ala	Gly	Glu	
				100					105					110			
20																	
	Ser	Ala	Lys	Leu	Gly	Leu	Asn	Val	Ala	Leu	Ile	Gly	Pro	Asp	Leu	Pro	
			115					120					125				
25																	
	Phe	Thr	Asn	Asn	Tyr	Gly	Val	Trp	Glu	Asp	Glu	Phe	Ile	Gly	Leu	Gly	
		130					135					140					
30																	
	Leu	Glu	Gly	Cys	Ile	Glu	His	Val	Trp	Arg	Asp	Thr	Val	Val	Tyr	Leu	
	145					150					155					160	
35																	
	Asp	Asp	Asn	Asp	Pro	Ile	Leu	Ile	Gly	Arg	Ala	Tyr	Gly	Arg	Val	Ser	
					165					170					175		
40																	
	Arg	Asp	Leu	Leu	His	Glu	Glu	Leu	Leu	Thr	Arg	Cys	Met	Glu	Ser	Gly	
			180						185					190			
45																	
	Val	Ser	Tyr	Leu	Ser	Ser	Lys	Val	Glu	Arg	Ile	Thr	Glu	Ala	Pro	Asn	
		195						200					205				
50																	
	Gly	Leu	Ser	Leu	Ile	Glu	Cys	Glu	Gly	Asn	Ile	Thr	Ile	Pro	Cys	Arg	
	210						215					220					
55																	
	Leu	Ala	Thr	Val	Ala	Ser	Gly	Ala	Ala	Ser	Gly	Lys	Leu	Leu	Gln	Tyr	
	225					230					235					240	

67

Glu Leu Gly Gly Pro Arg Val Cys Val Gln Thr Ala Tyr Gly Ile Glu  
 245 250 255

5 Val Glu Val Glu Ser Ile Pro Tyr Asp Pro Ser Leu Met Val Phe Met  
 260 265 270

10 Asp Tyr Arg Asp Tyr Thr Lys His Lys Ser Gln Ser Leu Glu Ala Gln  
 275 280 285

15 Tyr Pro Thr Phe Leu Tyr Val Met Pro Met Ser Pro Thr Lys Val Phe  
 290 295 300

Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala Ser Lys Glu Ala Met Pro Phe Glu Leu  
 305 310 315 320

20 Leu Lys Thr Lys Leu Met Ser Arg Leu Lys Thr Met Gly Ile Arg Ile  
 325 330 335

25 Thr Lys Thr Tyr Glu Glu Glu Trp Ser Tyr Ile Pro Val Gly Gly Ser  
 340 345 350

30 Leu Pro Asn Thr Glu Gln Lys Asn Leu Ala Phe Gly Ala Ala Ala Ser  
 355 360 365

35 Met Val His Pro Ala Thr Gly Tyr Ser Val Val Arg Ser Leu Ser Glu  
 370 375 380

Ala Pro Asn Tyr Ala Ala Val Ile Ala Lys Ile Leu Gly Lys Gly Asn  
 385 390 395 400

40 Ser Lys Gln Met Leu Asp His Gly Arg Tyr Thr Thr Asn Ile Ser Lys  
 405 410 415

45 Gln Ala Trp Glu Thr Leu Trp Pro Leu Glu Arg Lys Arg Gln Arg Ala  
 420 425 430

50 Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ala Leu Ile Val Gln Met Asp Ile Glu Gly  
 435 440 445

Thr Arg Thr Phe Phe Arg Thr Phe Phe Arg Leu Pro Thr Trp Met Trp  
 450 455 460  
 5

Trp Gly Phe Leu Gly Ser Ser Leu Ser Ser Thr Asp Leu Ile Ile Phe  
 465 470 475 480

10

Ala Phe Tyr Met Phe Ile Ile Ala Pro His Ser Leu Arg Met Gly Leu  
 485 490 495

15

Val Arg His Leu Leu Ser Asp Pro Thr Gly Gly Thr Met Leu Lys Ala  
 500 505 510

Tyr Leu Thr Ile  
 515  
 20

<210> 40

25

<211> 445  
 <212> DNA  
 <213> Tagetes erecta

30

<220>

35

<221> Sense Fragment  
 <222> (1)..(445)  
 <223>

40

<400> 40  
 aagcttgcac gaggcaaagc aaagggttggt tgttggttggt gttgagagac actccaatcc 60  
 45  
 aaacagatac aaggcgtgac tggatatttc tctctcgttc ctaacaacag caacgaagaa 120  
 gaaaaagaat cattactaac aatcaatgag tatgagagct ggacacatga cggcaacaat 180  
 50  
 ggcggtttt acatgcccta ggtttatgac tagcatcaga tacacgaagc aaattaagtg 240

caacgctgct aaaagccagc tagtcgttaa acaagagatt gaggaggaag aagattatgt 300  
 gaaagccggt ggatcggagc tgctttttgt tcaaatacaa cagaataagt ccatggatgc 360  
 5 acagtctagc ctatcccaaa agctcccaag ggtaccaata ggaggaggag gagacagtaa 420  
 ctgtatactg gatttgggtg tcgac 445  
 10  
 <210> 41  
 <211> 446  
 15 <212> DNA  
 <213> Tagetes erecta  
 20  
 <220>  
 <221> Antisense Fragment  
 25 <222> (1) .. (446)  
 <223>  
 30  
 <400> 41  
 gaattcgac gaggcaaagc aaagggtgtt tgttggtgtt gttgagagac actccaatcc 60  
 aaacagatac aaggcgtgac tggatatttc tctctcgttc ctaacaacag caacgaagaa 120  
 35 gaaaaagaat cattactaac aatcaatgag tatgagagct ggacacatga cggcaacaat 180  
 ggcggctttt acatgcccta ggtttatgac tagcatcaga tacacgaagc aaattaagtg 240  
 40 caacgctgct aaaagccagc tagtcgttaa acaagagatt gaggaggaag aagattatgt 300  
 gaaagccggt ggatcggagc tgctttttgt tcaaatacaa cagaataagt ccatggatgc 360  
 acagtctagc ctatcccaaa agctcccaag ggtaccaata ggaggaggag gagacagtaa 420  
 45 ctgtatactg gatttgggtg gatcct 446  
 <210> 42  
 50

<211> 393

<212> DNA

5 <213> Tagetes erecta

<220>

10

<221> Sense Fragment

<222> (1) .. (393)

15

<223>

<400> 42

20 aagctttgga ttagcactga ttgtccagat ggatattgag gggaccgcga cattcttccg 60  
gactttcttc cgcttgccca catggatgtg gtggggggtt cttggatctt cgttatcatc 120  
aactgacttg ataatatattg cgttttacat gtttatcata gcaccgcata gcctgagaat 180  
25 gggctctgggt agacatttgc tttctgaccc gacaggagga acaatgttaa aagcgtatct 240  
cacgatataa ataactctag tcgcgatcag tttagattat aggcacatct tgcatatata 300  
30 tatgtataaa ccttatgtgt gctgtatcct tacatcaaca cagtcattaa ttgtatttct 360  
tggggtaatg ctgatgaagt attttctgtc gac 393

35

<210> 43

<211> 397

<212> DNA

40

<213> Tagetes erecta

45

<220>

<221> Antisense Fragment

<222> (1) .. (397)

50

&lt;223&gt;

5 <400> 43  
gaattctctt tggatttagca ctgattgtcc agatggatat tgagggggacc cgcacattct 60  
tccggacttt cttccgcttg cccacatgga tgtggtgggg gtttcttgga tcttcgttat 120  
10 catcaactga cttgataata tttgcgtttt acatgtttat catagcaccg catagcctga 180  
gaatgggtct ggtttagacat ttgctttctg acccgacagg aggaacaatg ttaaaagcgt 240  
atctcacgat ataaataact ctagtcgcga tcagttaga ttataggcac atcttcgata 300  
15 tatatatgta taaaccttat gtgtgctgta tccttacatc aacacagtca ttaattgtat 360  
ttcttggggg aatgctgatg aagtattttc tggatcc 397

20

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 1537

25 &lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; -

30

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; promoter

35 &lt;222&gt; (1)..(1537)

&lt;223&gt;

40

&lt;400&gt; 44

gagctctaca aattaggggt actttattca ttttcatcca ttctctttat tgttaaattt 60

tgtacattta ttcaataata ttatatgttt attacaaatt ctcactttct tattcatacc 120

45

tattcactca agcctttacc atcttctctt tctatttcaa tactatttct acttcatttt 180

tcacgttttt aacatctttc tttatttctt gtccacttcg tttagggatg cctaagtgtc 240

50

caaatttcat ctctcgtagt aacacaaaac caatgtaatg ctacttctct ctacattttt 300



aatacaaata aagtgaaaca aaatatctat aaataaaca atatatatat ttgttagac 360  
gctgtctcaa cccatcaatt aaaaaat tttgtatatttc tactttacct actaaatttg 420  
5 tttctcatat ttacctttta acccccacaa aaaaaatta taaaaaagaa agaaaaaagc 480  
taaaccctat ttaaataagct aactataaga tcttaaaatt atcctcatca gtgtatagtt 540  
10 taattgggta ttaacttata acattatata tctatgacat atactctctc ctagctat ttt 600  
ctcacatttt ttaacttaag aaaatagtc taacatagtc taaaattcaa acatccacat 660  
gctctaattt gattaacaaa aagttagaaa tattttattt aataaaaaag actaataaat 720  
15 atataaaatg aatgttcata cgcagacca tttagagatg agtatgcttt cacatgctga 780  
gattattttt aaaactaagg ttgtagcaat attaaatcaa taaaattatt ataaataaca 840  
20 aaattaacct gctcgtgttt gctgtatatg ggaggctaca aaataaatta aactaaagat 900  
gattatgttt tagacatttt ttctatctgt attagtttat acatattaat tcaggagctg 960  
cacaacccaa ttctattttt gttccttggg ggctgggttt ctcaacagg tcaatagtca 1020  
25 atattagggt ttattggact tttaatagta tcaaacaaat ctatgtgtga acttaaaaat 1080  
tgtattaaat atttagggta acctgttgcc gtttttagaa taatgtttct tcttaataca 1140  
30 cgaaagcgta ttgtgtattc attcatttgg cgcctcacat gcttcgggtg gctcgtttta 1200  
gtctctgcct tctttgtata ttgtactccc cctcttcta tgccacgtgt tctgagctta 1260  
acaagccacg ttgcgtgcca ttgccaaaca agtcatttta acttcacaag gtccgatttg 1320  
35 acctccaaaa caacgacaag tttccgaaca gtcgcgaaga tcaagggtat aatcgtcttt 1380  
ttgaattcta tttctcttta tttaatagtc cctctcgtgt gatagttttt aaaagatttt 1440  
40 taaaacgtag ctgctgttta agtaaatccc agtccttcag tttgtgcttt tgtgtgtttt 1500  
gtttctctga tttacggaat ttggaaataa taagctt 1537  
  
45 <210> 45  
<211> 734  
<212> DNA  
50

&lt;213&gt; kuenstliche Sequenz

5 &lt;220&gt;

&lt;221&gt; variation

&lt;222&gt; (1)..(734)

10

&lt;223&gt;

15 &lt;400&gt; 45

ctaacaatca atgagtagag agctggacac atgacggcaa caatggcggc ttttacatgc 60

cctaggttta tgactagcat cagatacacg aagcaaatta agtgcaacgc tgctaaaagc 120

20 cagctagtcg ttaaacaaga gattgaggag gaagaagatt atgtgaaagc cgggtggatcg 180

gagctgcttt ttgttcaaat gcaacagaat aagtccatgg atgcacagtc tagcctatcc 240

caaaagggtca ctccagactt aattgcttat aaataaataa atatgttttt taggaataat 300

25 gatattttaga tagattagct atcacctgtg ctgtgggtgtg cagctcccaa ggggtcttacc 360

gatagtaaaa tcgttagtta tgattaatac ttgggaggtg ggggattata ggctttgttg 420

30 tgagaatggt gagaaagagg ttgacaaat cgggtgtttga atgagggttaa atggagttaa 480

attaaaataa agagaagaga aagattaaga gggatgatggg gatattaaag acggscaata 540

tagtgatgcc acgtagaaaa aggtaagtga aaacatacaa cgtggcttta aaagatggct 600

35 tggctgctaa tcaactcaac tcaactcata tcctatccat tcaaattcaa ttcaattcta 660

ttgaatgcaa agcaaagcaa aggttggttg ttgttggtgt tgagagacac tccaatccaa 720

40 acagatacaa ggcg 734

&lt;210&gt; 46

45 &lt;211&gt; 280

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; kuenstliche Sequenz

50

<220>

5 <221> variation

<222> (1)..(280)

<223>

10

<400> 46

15 gtcgagtatg gagttcaatt aaaataaaga gaagaaaaag attaagaggg tgatggggat 60

attaaagacg gccaatrtag tgatgccacg taagaaaaag gtaagtgaaa acatacaacg 120

tggcttttaa agatggcttg gctgctaata aactcaactc aactcatatc ctatccattc 180

20 aaattcaatt caattctatt gaatgcaaag caaagcaaag caaaggttgt ttgttgttgt 240

tggtgagaga cactccaatc caaacagata caaggcgtga 280

25 <210> 47

<211> 358

<212> DNA

30 <213> Tagetes erecta

35 <220>

<221> Sense Promotor

<222> (1)..(358)

40 <223>

45 <400> 47

aagcttaccg atagtaaaat cgttagttat gattaatact tgggaggtgg gggattatag 60

gctttgttgt gagaatgttg agaaagaggt ttgacaaatc ggtgtttgaa tgagggtaaa 120

50 tggagtttaa ttaaaataaa gagaagagaa agattaagag ggtgatgggg atattaaaga 180

5 cggccaatat agtgatgcca cgtagaaaaa ggtaagtgaa aacatacaac gtggctttaa 240  
 aagatggctt ggctgctaata caactcaact caactcatat cctatccatt caaattcaat 300  
 tcaattctat tgaatgcaaa gcaaagcaaa gcaaagggtt tttgttggtt ttgtcgac 358

10 <210> 48  
 <211> 361  
 <212> DNA

15 <213> Tagetes erecta

20 <220>  
 <221> Antisense Promotor  
 <222> (1)..(361)

25 <223>

30 <400> 48  
 ctcgagctta cccatagtaa aatcgtagt tatgattaat acttgggagg tgggggatta 60  
 taggctttgt tgtgagaatg ttgagaaaga ggtttgacaa atcgggtgtt gaatgaggtt 120  
 aatgggagtt taattaaaat aaagagaaga gaaagattaa gaggggtgat gggatattaa 180  
 35 agacggccaa tatagtgatg ccacgtagaa aaaggtaagt gaaaacatac aacgtggctt 240  
 taaaagatgg cttggctgct aatcaactca actcaactca tatectatcc attcaaattc 300  
 40 aattcaattc tattgaatgc aaagcaaagc aaagcaaagg ttgtttgttg ttgttggttc 360  
 c 361

45 <210> 49  
 <211> 28  
 <212> DNA

50

<213> kuenstliche Sequenz

5 <220>

<221> Primer

10 <222> (1) .. (28)

<223>

15 <400> 49  
gagctcactc actgatttcc attgcttg

28

20 <210> 50

<211> 37

<212> DNA

25 <213> kuenstliche Sequenz

30 <220>

<221> Primer

<222> (1) .. (37)

35 <223>

40 <400> 50  
cgccgttaag tcgatgtccg ttgatttaaa cagtgtc

37

<210> 51

45 <211> 34

<212> DNA

50 <213> kuenstliche Sequenz

<220>

5 <221> Primer

<222> (1)..(34)

<223>

10

<400> 51

atcaacggac atcgacttaa cggcgtttgt aaac

34

15

<210> 52

<211> 25

20

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

25

<220>

<221> Primer

30

<222> (1)..(25)

<223>

35

<400> 52

taagcttttt gttgaagaga tttgg

25

40

<210> 53

<211> 23

45

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

50

<220>

<221> Primer

5 <222> (1)..(23)

<223>

10

<400> 53  
gaaaataactt catcagcatt acc

23

15 <210> 54

<211> 28

<212> DNA

20

<213> kuenstliche Sequenz

25 <220>

<221> Primer

<222> (1)..(28)

30

<223>

35 <400> 54  
gtcgactacg taagtttctg cttctacc

28

<210> 55

40

<211> 26

<212> DNA

45 <213> kuenstliche Sequenz

<220>

50

<221> Primer

<222> (1)..(26)

5 <223>

<400> 55

10 ggatccggtg atacctgcac atcaac

26

<210> 56

15 <211> 28

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

20

<220>

25 <221> Primer

<222> (1)..(28)

<223>

30

<400> 56

35 aagcttgac gaggcacaaagc aaagggttg

28

<210> 57

<211> 29

40

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

45

<220>

<221> Primer

50



<222> (1) .. (29)

<223>

5

<400> 57

gtcgacaacc aaatccagta tacagttac

29

10

<210> 58

<211> 30

15

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

20

<220>

<221> Primer

25

<222> (1) .. (30)

<223>

30

<400> 58

aggatccaac caaatccagt atacagttac

30

35

<210> 59

<211> 28

<212> DNA

40

<213> kuenstliche Sequenz

45

<220>

<221> Primer

<222> (1) .. (28)

50

&lt;223&gt;

5 <400> 59  
gaattcgcac gaggcaaagc aaagggttg

28

10 <210> 60

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

15 <213> kuenstliche Sequenz

&lt;220&gt;

20

&lt;221&gt; Primer

&lt;222&gt; (1) .. (25)

25 <223>

30 <400> 60  
aagcttttggga ttagcactga ttgtc

25

&lt;210&gt; 61

35 <211> 29

&lt;212&gt; DNA

40 <213> kuenstliche Sequenz

&lt;220&gt;

45 <221> Primer

&lt;222&gt; (1) .. (29)

&lt;223&gt;

50

	<400> 61	
	gtcgacagaa aatacttcat cagcattac	29
5		
	<210> 62	
	<211> 29	
10	<212> DNA	
	<213> kuenstliche Sequenz	
15		
	<220>	
	<221> Primer	
20	<222> (1) .. (29)	
	<223>	
25		
	<400> 62	
	ggatccagaa aatacttcat cagcattac	29
30		
	<210> 63	
	<211> 27	
35	<212> DNA	
	<213> kuenstliche Sequenz	
40		
	<220>	
	<221> Primer	
45	<222> (1) .. (27)	
	<223>	
50		

<400> 63  
gaattctctt tggattagca ctgattg

27

5 <210> 64

<211> 23

<212> DNA

10

<213> kuenstliche Sequenz

15 <220>

<221> Primer

<222> (1)..(23)

20

<223>

25 <400> 64  
cgccttgtat ctgtttggat tgg

23

<210> 65

30

<211> 24

<212> DNA

35 <213> kuenstliche Sequenz

<220>

40

<221> Primer

<222> (1)..(24)

45 <223>

<400> 65

50 ctaacaatca atgagtatga gagc

24

5      <210>    66  
       <211>    26  
       <212>    DNA  
 10      <213>    kuenstliche Sequenz  
       <220>  
 15      <221>    Primer  
       <222>    (1) .. (26)  
 20      <223>  
       <400>    66  
 25      agagcaaggc cagcaggacc acaacc  
       <210>    67  
       <211>    26  
 30      <212>    DNA  
       <213>    kuenstliche Sequenz  
 35      <220>  
       <221>    Primer  
 40      <222>    (1) .. (26)  
       <223>  
 45      <400>    67  
       ccttgggagc ttttgggata ggctag  
 50

26

26

<210> 68  
 <211> 26  
 5 <212> DNA  
 <213> kuenstliche Sequenz  
 10  
 <220>  
 <221> Primer  
 15 <222> (1)..(26)  
 <223>  
 20  
 <400> 68  
 tcacgccttg tatctgtttg gattgg  
 25 <210> 69  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 30 <213> kuenstliche Sequenz  
 35 <220>  
 <221> Primer  
 <222> (1)..(15)  
 40 <223>  
 45 <400> 69  
 gtcgagtatg gagtt  
 50  
 <210> 70

26

15

<211> 28

<212> DNA

5 <213> kuenstliche Sequenz

<220>

10 <221> Primer

<222> (1) .. (28)

15 <223>

<400> 70

20 aagcttaccg atagtaaaat cgtagtt 28

<210> 71

25 <211> 31

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

30

<220>

35 <221> Primer

<222> (1) .. (31)

<223>

40

<400> 71

45 ctcgagctta ccgataagtaa aatcgtagt t 31

<210> 72

<211> 28

50

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

5

<400> 72  
gtcgacaaca acaacaaaca acctttgc 28

10

<210> 73

<211> 28

15 <212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

20

<220>

<221> Primer

25 <222> (1) .. (28)

<223>

30

<400> 73  
ggatccaaca acaacaaaca acctttgc 28

35 <210> 74

<211> 28

<212> DNA

40 <213> kuenstliche Sequenz

45 <220>

<221> Primer

<222> (1) .. (28)

50



&lt;223&gt;

5 <400> 74  
gtcgactttt tgttgaagag atttggtg

28

10 <210> 75

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

15 <213> kuenstliche Sequenz

20 <220>

&lt;221&gt; Primer

&lt;222&gt; (1) .. (28)

25 <223>

30 <400> 75  
ctcgagactc actgatttcc attgcttg

28

&lt;210&gt; 76

35 <211> 22

&lt;212&gt; DNA

40 <213> kuenstliche Sequenz

&lt;220&gt;

45 <221> Primer

&lt;222&gt; (1) .. (22)

&lt;223&gt;

50

	<400> 76	
	gagctctaca aattaggggtt ac	22
5		
	<210> 77	
	<211> 23	
10	<212> DNA	
	<213> kuenstliche Sequenz	
15		
	<220>	
	<221> Primer	
20	<222> (1)..(23)	
	<223>	
25		
	<400> 77	
	aagcttatta tttccaaatt ccg	23
30		
	<210> 78	
	<211> 50	
35	<212> DNA	
	<213> kuenstliche Sequenz	
40		
	<220>	
	<221> Primer	
45	<222> (1)..(50)	
	<223>	
50		

<400> 78  
 aagcttttgca attcatacag aagtgagaaa aatgcagcta gcagcgacag 50

5 <210> 79  
 <211> 1062  
 <212> DNA  
 10 <213> Haematococcus pluvialis

15 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (32) .. (1021)  
 20 <223>

25 <400> 79  
 aagcttttgca attcatacag aagtgagaaa a atg cag cta gca gcg aca gta 52  
 Met Gln Leu Ala Ala Thr Val  
 1 5

30 atg ttg gag cag ctt acc gga agc gct gag gca ctc aag gag aag gag 100  
 Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu  
 10 15 20

35 aag gag gtt gca ggc agc tct gac gtg ttg cgt aca tgg gcg acc cag 148  
 Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln  
 25 30 35

40 tac tcg ctt ccg tca gag gag tca gac gcg gcc cgc ccg gga ctg aag 196  
 Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys  
 40 45 50 55

45 aat gcc tac aag cca cca cct tcc gac aca aag ggc atc aca atg gcg 244  
 Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala  
 60 65 70

cta gct gtc atc ggc tcc tgg gcc gca gtg ttc ctc cac gcc att ttt 292  
 Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe  
 75 80 85

50 caa atc aag ctt ccg acc tcc ttg gac cag ctg cac tgg ctg ccc gtg 340

## 91

	Gln	Ile	Lys	Leu	Pro	Thr	Ser	Leu	Asp	Gln	Leu	His	Trp	Leu	Pro	Val	
	90							95					100				
5	tca	gat	gcc	aca	gct	cag	ctg	gtt	agc	ggc	agc	agc	agc	ctg	ctg	cac	388
	Ser	Asp	Ala	Thr	Ala	Gln	Leu	Val	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Leu	Leu	His	
	105						110					115					
10	atc	gtc	gta	gta	ttc	ttt	gtc	ctg	gag	ttc	ctg	tac	aca	ggc	ctt	ttt	436
	Ile	Val	Val	Val	Phe	Phe	Val	Leu	Glu	Phe	Leu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Phe	
	120					125					130				135		
15	atc	acc	acg	cat	gat	gct	atg	cat	ggc	acc	atc	gcc	atg	aga	aac	agg	484
	Ile	Thr	Thr	His	Asp	Ala	Met	His	Gly	Thr	Ile	Ala	Met	Arg	Asn	Arg	
					140					145					150		
	cag	ctt	aat	gac	ttc	ttg	ggc	aga	gta	tgc	atc	tcc	ttg	tac	gcc	tgg	532
	Gln	Leu	Asn	Asp	Phe	Leu	Gly	Arg	Val	Cys	Ile	Ser	Leu	Tyr	Ala	Trp	
				155					160					165			
20	ttt	gat	tac	aac	atg	ctg	cac	cgc	aag	cat	tgg	gag	cac	cac	aac	cac	580
	Phe	Asp	Tyr	Asn	Met	Leu	His	Arg	Lys	His	Trp	Glu	His	His	Asn	His	
		170						175					180				
25	act	ggc	gag	gtg	ggc	aag	gac	cct	gac	ttc	cac	agg	gga	aac	cct	ggc	628
	Thr	Gly	Glu	Val	Gly	Lys	Asp	Pro	Asp	Phe	His	Arg	Gly	Asn	Pro	Gly	
	185						190					195					
30	att	gtg	ccc	tgg	ttt	gcc	agc	ttc	atg	tcc	agc	tac	atg	tcg	atg	tgg	676
	Ile	Val	Pro	Trp	Phe	Ala	Ser	Phe	Met	Ser	Ser	Tyr	Met	Ser	Met	Trp	
	200					205					210				215		
35	cag	ttt	gcg	cgc	ctc	gca	tgg	tgg	acg	gtg	gtc	atg	cag	ctg	ctg	ggt	724
	Gln	Phe	Ala	Arg	Leu	Ala	Trp	Trp	Thr	Val	Val	Met	Gln	Leu	Leu	Gly	
					220					225					230		
	gcg	cca	atg	gcg	aac	ctg	ctg	gtg	ttc	atg	gcg	gcc	gcg	ccc	atc	ctg	772
	Ala	Pro	Met	Ala	Asn	Leu	Leu	Val	Phe	Met	Ala	Ala	Ala	Pro	Ile	Leu	
				235					240					245			
40	tcc	gcc	ttc	cgc	ttg	ttc	tac	ttt	ggc	acg	tac	atg	ccc	cac	aag	cct	820
	Ser	Ala	Phe	Arg	Leu	Phe	Tyr	Phe	Gly	Thr	Tyr	Met	Pro	His	Lys	Pro	
		250						255					260				
45	gag	cct	ggc	gcc	gcg	tca	ggc	tct	tca	cca	gcc	gtc	atg	aac	tgg	tgg	868
	Glu	Pro	Gly	Ala	Ala	Ser	Gly	Ser	Ser	Pro	Ala	Val	Met	Asn	Trp	Trp	
	265						270					275					
50	aag	tcg	cgc	act	agc	cag	gcg	tcc	gac	ctg	gtc	agc	ttt	ctg	acc	tgc	916
	Lys	Ser	Arg	Thr	Ser	Gln	Ala	Ser	Asp	Leu	Val	Ser	Phe	Leu	Thr	Cys	
	280					285					290				295		

tac cac ttc gac ctg cac tgg gag cac cac cgc tgg ccc ttt gcc ccc 964  
 Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro  
 300 305 310

5

tgg tgg gag ctg ccc aac tgc cgc cgc ctg tct ggc cga ggt ctg gtt 1012  
 Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val  
 315 320 325

10

cct gcc tag ctggacacac tgcagtgggc cctgctgcca gctgggcatg c 1062  
 Pro Ala

15

<210> 80  
 <211> 329  
 <212> PRT

20

<213> Haematococcus pluvialis

25

<400> 80  
 Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala  
 1 5 10 15

30

Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val  
 20 25 30

35

Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp  
 35 40 45

40

Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp  
 50 55 60

45

Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala  
 65 70 75 80

50

Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp  
 85 90 95

## 93

	Gln	Leu	His	Trp	Leu	Pro	Val	Ser	Asp	Ala	Thr	Ala	Gln	Leu	Val	Ser	
					100				105					110			
5	Gly	Ser	Ser	Ser	Leu	Leu	His	Ile	Val	Val	Val	Phe	Phe	Val	Leu	Glu	
					115			120					125				
10	Phe	Leu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Phe	Ile	Thr	Thr	His	Asp	Ala	Met	His	Gly	
		130					135					140					
15	Thr	Ile	Ala	Met	Arg	Asn	Arg	Gln	Leu	Asn	Asp	Phe	Leu	Gly	Arg	Val	
	145					150					155				160		
20	Cys	Ile	Ser	Leu	Tyr	Ala	Trp	Phe	Asp	Tyr	Asn	Met	Leu	His	Arg	Lys	
					165					170					175		
25	His	Trp	Glu	His	His	Asn	His	Thr	Gly	Glu	Val	Gly	Lys	Asp	Pro	Asp	
				180					185					190			
30	Phe	His	Arg	Gly	Asn	Pro	Gly	Ile	Val	Pro	Trp	Phe	Ala	Ser	Phe	Met	
			195				200						205				
35	Ser	Ser	Tyr	Met	Ser	Met	Trp	Gln	Phe	Ala	Arg	Leu	Ala	Trp	Trp	Thr	
	210						215						220				
40	Val	Val	Met	Gln	Leu	Leu	Gly	Ala	Pro	Met	Ala	Asn	Leu	Leu	Val	Phe	
	225					230					235				240		
45	Met	Ala	Ala	Ala	Pro	Ile	Leu	Ser	Ala	Phe	Arg	Leu	Phe	Tyr	Phe	Gly	
					245				250					255			
50	Thr	Tyr	Met	Pro	His	Lys	Pro	Glu	Pro	Gly	Ala	Ala	Ser	Gly	Ser	Ser	
			260					265					270				
55	Pro	Ala	Val	Met	Asn	Trp	Trp	Lys	Ser	Arg	Thr	Ser	Gln	Ala	Ser	Asp	
		275					280						285				
60	Leu	Val	Ser	Phe	Leu	Thr	Cys	Tyr	His	Phe	Asp	Leu	His	Trp	Glu	His	
	290						295					300					

His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg  
 305 310 315 320

5

Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala  
 325

10

<210> 81

<211> 831

15

<212> DNA

<213> Haematococcus pluvialis

20

<220>

<221> CDS

25

<222> (1)..(831)

<223>

30

<400> 81

atg cca tcc gag tcg tca gac gca gct cgt cct gtg ttg aag cac gcc 48  
 Met Pro Ser Glu Ser Ser Asp Ala Ala Arg Pro Val Leu Lys His Ala  
 1 5 10 15

35

tat aaa cct cca gca tct gac gcc aag ggc atc act atg gcg ctg acc 96  
 Tyr Lys Pro Pro Ala Ser Asp Ala Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Thr  
 20 25 30

40

atc att ggc acc tgg acc gca gtg ttt tta cac gca ata ttc caa atc 144  
 Ile Ile Gly Thr Trp Thr Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile  
 35 40 45

45

agg cta ccg aca tcc atg gac cag ctt cac tgg ttg cct gtg tcc gaa 192  
 Arg Leu Pro Thr Ser Met Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Glu  
 50 55 60

50

gcc aca gcc cag ctg ttg ggc gga agc agc agc cta ttg cac atc gcc 240  
 Ala Thr Ala Gln Leu Leu Gly Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Ala  
 65 70 75 80

	gca gtc ttc att gta ctt gag ttt ctg tac act ggt cta ttc atc acc	288
	Ala Val Phe Ile Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr	
	85 90 95	
5	acg cat gat gca atg cat ggc acc ata gct ttg agg aac agg cag ctc	336
	Thr His Asp Ala Met His Gly Thr Ile Ala Leu Arg Asn Arg Gln Leu	
	100 105 110	
10	aat gat ctc ctt ggc aac atc tgc ata tca ctg tac gcc tgg ttt gac	384
	Asn Asp Leu Leu Gly Asn Ile Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp	
	115 120 125	
15	tac agc atg cac tgg gag cac cac aac cat act ggc gaa gtg ggg aaa	432
	Tyr Ser Met His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys	
	130 135 140	
20	gac cct gac ttc cac aaa gga aat cct ggc ctt gtc ccc tgg ttc gcc	480
	Asp Pro Asp Phe His Lys Gly Asn Pro Gly Leu Val Pro Trp Phe Ala	
	145 150 155 160	
25	agc ttc atg tcc agc tac atg tcc ctg tgg cag ttt gcc cgg ctg gca	528
	Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Leu Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala	
	165 170 175	
30	tgg tgg gca gtg gtg atg caa acg ttg ggg gcc ccc atg gcg aat ctc	576
	Trp Trp Ala Val Val Met Gln Thr Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu	
	180 185 190	
35	cta gtc ttc atg gct gca gcc cca atc ttg tca gca ttc cgc ctc ttc	624
	Leu Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe	
	195 200 205	
40	tac ttc ggc act tac ctg cca cac aag cct gag cca ggc cct gca gca	672
	Tyr Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Pro Ala Ala	
	210 215 220	
45	ggc tct cag gtc atg tct tgg ttc agg gcc aag aca agt gag gca tct	720
	Gly Ser Gln Val Met Ser Trp Phe Arg Ala Lys Thr Ser Glu Ala Ser	
	225 230 235 240	
50	gat gtg atg agc ttc ctg aca tgc tac cac ttt gac ctg ttt gcc ccc	768
	Asp Val Met Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu Phe Ala Pro	
	245 250 255	
55	tgg tgg cag ctg ccc cac tgc cgc cgc ctg tct ggg cgt ggc ctg gtg	816
	Trp Trp Gln Leu Pro His Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val	
	260 265 270	
60	cct gcc ttg gca tga	831



Pro Ala Leu Ala  
275

5 <210> 82

<211> 276

<212> PRT

10

<213> Haematococcus pluvialis

15 <400> 82

Met Pro Ser Glu Ser Ser Asp Ala Ala Arg Pro Val Leu Lys His Ala  
1 5 10 15

20

Tyr Lys Pro Pro Ala Ser Asp Ala Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Thr  
20 25 30

25

Ile Ile Gly Thr Trp Thr Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile  
35 40 45

30

Arg Leu Pro Thr Ser Met Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Glu  
50 55 60

35

Ala Thr Ala Gln Leu Leu Gly Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Ala  
65 70 75 80

Ala Val Phe Ile Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr  
85 90 95

40

Thr His Asp Ala Met His Gly Thr Ile Ala Leu Arg Asn Arg Gln Leu  
100 105 110

45

Asn Asp Leu Leu Gly Asn Ile Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp  
115 120 125

50

Tyr Ser Met His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys  
130 135 140

5      Asp Pro Asp Phe His Lys Gly Asn Pro Gly Leu Val Pro Trp Phe Ala  
       145                               150                               155                               160

10      Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Leu Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala  
                                   165                               170                               175

15      Trp Trp Ala Val Val Met Gln Thr Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu  
                                   180                               185                               190

20      Leu Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe  
                                   195                               200                               205

25      Tyr Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Pro Ala Ala  
                                   210                               215                               220

30      Gly Ser Gln Val Met Ser Trp Phe Arg Ala Lys Thr Ser Glu Ala Ser  
                                   225                               230                               235                               240

35      Asp Val Met Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu Phe Ala Pro  
                                   245                               250                               255

40      Trp Trp Gln Leu Pro His Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val  
                                   260                               265                               270

45      Pro Ala Leu Ala  
                                   275

50      <210> 83  
           <211> 729  
           <212> DNA  
           <213> Paracoccus sp. MBIC1143  
           <220>

<221> CDS

<222> (1) . . (729)

5      <223>

<400> 83

10	atg agc gca cat gcc ctg ccc aag gcagat ctg acc gcc acc agc ctg Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu 1 5 10 15	48
15	atc gtc tcg ggc ggc atc atc gcc gct tgg ctg gcc ctg cat gtg cat Ile Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His 20 25 30	96
20	gcg ctg tgg ttt ctg gac gca gcg gcg cat ccc atc ctg gcg atc gca Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Ile Ala 35 40 45	144
25	aat ttc ctg ggg ctg acc tgg ctg tcg gtc gga ttg ttc atc atc gcg Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala 50 55 60	192
30	cat gac gcg atg cac ggg tcg gtg gtg ccg ggg cgt ccg cgc gcc aat His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn 65 70 75 80	240
35	gcg gcg atg ggc cag ctt gtc ctg tgg ctg tat gcc gga ttt tcg tgg Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp 85 90 95	288
40	cgc aag atg atc gtc aag cac atg gcc cat cac cgc cat gcc gga acc Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr 100 105 110	336
45	gac gac gac ccc gat ttc gac cat ggc ggc ccg gtc cgc tgg tac gcc Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala 115 120 125	384
50	cgc ttc atc ggc acc tat ttc ggc tgg cgc gag ggg ctg ctg ctg ccc Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro 130 135 140	432
55	gtc atc gtg acg gtc tat gcg ctg atc ctt ggg gat cgc tgg atg tac Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr 145 150 155 160	480
60	gtg gtc ttc tgg ccg ctg ccg tcg atc ctg gcg tcg atc cag ctg ttc	528

## 99

	Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe	
	165 170 175	
5	gtg ttc ggc acc tgg ctg ccg cac cgc ccc ggc cac gac gcg ttc ccg Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro	576
	180 185 190	
10	gac cgc cac aat gcg cgg tcg tcg cgg atc agc gac ccc gtg tcg ctg Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu	624
	195 200 205	
15	ctg acc tgc ttt cac ttt ggc ggt tat cat cac gaa cac cac ctg cac Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His	672
	210 215 220	
	ccg acg gtg ccg tgg tgg cgc ctg ccc agc acc cgc acc aag ggg gac Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp	720
	225 230 235 240	
20	acc gca tga Thr Ala	729
25	<210> 84 <211> 242 <212> PRT	
30	<213> Paracoccus sp. MBIC1143	
35	<400> 84 Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu	
	1 5 10 15	
40	Ile Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His	
	20 25 30	
45	Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Ile Ala	
	35 40 45	
50	Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala	
	50 55 60	

5 His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn  
 65 70 75 80

Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp  
 85 90 95

10 Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr  
 100 105 110

15 Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala  
 115 120 125

20 Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro  
 130 135 140

25 Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr  
 145 150 155 160

Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe  
 165 170 175

30 Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro  
 180 185 190

35 Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu  
 195 200 205

40 Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His  
 210 215 220

45 Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp  
 225 230 235 240

Thr Ala

&lt;210&gt; 85

&lt;211&gt; 735

5 &lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Brevundimonas aurantiaca

10

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

15 &lt;222&gt; (1) .. (735)

&lt;223&gt;

20

&lt;400&gt; 85

atg acc gcc gcc gtc gcc gag cca cgc acc gtc ccg cgc cag acc tgg	48
Met Thr Ala Ala Val Ala Glu Pro Arg Thr Val Pro Arg Gln Thr Trp	
1 5 10 15	

25

atc ggt ctg acc ctg gcg gga atg atc gtg gcg gga tgg gcg gtt ctg	96
Ile Gly Leu Thr Leu Ala Gly Met Ile Val Ala Gly Trp Ala Val Leu	
20 25 30	

30

cat gtc tac gcc gtc tat ttt cac cga tgg ggg ccg ttg acc ctg gtg	144
His Val Tyr Gly Val Tyr Phe His Arg Trp Gly Pro Leu Thr Leu Val	
35 40 45	

35

atc gcc ccg gcg atc gtg gcg gtc cag acc tgg ttg tcg gtc gcc ctt	192
Ile Ala Pro Ala Ile Val Ala Val Gln Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu	
50 55 60	

40

ttc atc gtc gcc cat gac gcc atg tac gcc tcc ctg gcg ccg gga cgg	240
Phe Ile Val Ala His Asp Ala Met Tyr Gly Ser Leu Ala Pro Gly Arg	
65 70 75 80	

45

ccg cgg ctg aac gcc gca gtc gcc cgg ctg acc ctg ggg ctc tat gcg	288
Pro Arg Leu Asn Ala Ala Val Gly Arg Leu Thr Leu Gly Leu Tyr Ala	
85 90 95	

ggc ttc cgc ttc gat cgg ctg aag acg gcg cac cac gcc cac cac gcc	336
Gly Phe Arg Phe Asp Arg Leu Lys Thr Ala His His Ala His His Ala	
100 105 110	

50

gcg ccc gcc acg gcc gac gac ccg gat ttt cac gcc ccg gcg ccc cgc	384
---	-----

## 102

	Ala	Pro	Gly	Thr	Ala	Asp	Asp	Pro	Asp	Phe	His	Ala	Pro	Ala	Pro	Arg	
	115				120				125								
5	gcc	ttc	ctt	ccc	tgg	ttc	ctg	aac	ttc	ttt	cgc	acc	tat	ttc	ggc	tgg	432
	Ala	Phe	Leu	Pro	Trp	Phe	Leu	Asn	Phe	Phe	Arg	Thr	Tyr	Phe	Gly	Trp	
	130				135				140								
10	cgc	gag	atg	gcg	gtc	ctg	acc	gcc	ctg	gtc	ctg	atc	gcc	ctc	ttc	ggc	480
	Arg	Glu	Met	Ala	Val	Leu	Thr	Ala	Leu	Val	Leu	Ile	Ala	Leu	Phe	Gly	
	145				150				155				160				
15	ctg	ggg	gcg	cgg	ccg	gcc	aat	ctc	ctg	acc	ttc	tgg	gcc	gcg	ccg	gcc	528
	Leu	Gly	Ala	Arg	Pro	Ala	Asn	Leu	Leu	Thr	Phe	Trp	Ala	Ala	Pro	Ala	
	165				170				175								
	ctg	ctt	tca	gcg	ctt	cag	ctc	ttc	acc	ttc	ggc	acc	tgg	ctg	ccg	cac	576
	Leu	Leu	Ser	Ala	Leu	Gln	Leu	Phe	Thr	Phe	Gly	Thr	Trp	Leu	Pro	His	
	180				185				190								
20	cgc	cac	acc	gac	cag	ccg	ttc	gcc	gac	gcg	cac	cac	gcc	cgc	agc	agc	624
	Arg	His	Thr	Asp	Gln	Pro	Phe	Ala	Asp	Ala	His	His	Ala	Arg	Ser	Ser	
	195				200				205								
25	ggc	tac	ggc	ccc	gtg	ctt	tcc	ctg	ctc	acc	tgt	ttc	cac	ttc	ggc	cgc	672
	Gly	Tyr	Gly	Pro	Val	Leu	Ser	Leu	Leu	Thr	Cys	Phe	His	Phe	Gly	Arg	
	210				215				220								
30	cac	cac	gaa	cac	cat	ctg	agc	ccc	tgg	cgg	ccc	tgg	tgg	cgt	ctg	tgg	720
	His	His	Glu	His	His	Leu	Ser	Pro	Trp	Arg	Pro	Trp	Trp	Arg	Leu	Trp	
	225				230				235				240				
35	cgc	ggc	gag	tct	tga												735
	Arg	Gly	Glu	Ser													
40																	
	<210>	86															
	<211>	244															
	<212>	PRT															
	<213>	Brevundimonas aurantiaca															
45																	
	<400>	86															
50	Met	Thr	Ala	Ala	Val	Ala	Glu	Pro	Arg	Thr	Val	Pro	Arg	Gln	Thr	Trp	
	1					5					10					15	

	Ile	Gly	Leu	Thr	Leu	Ala	Gly	Met	Ile	Val	Ala	Gly	Trp	Ala	Val	Leu	
			20						25					30			
5																	
	His	Val	Tyr	Gly	Val	Tyr	Phe	His	Arg	Trp	Gly	Pro	Leu	Thr	Leu	Val	
		35						40					45				
10																	
	Ile	Ala	Pro	Ala	Ile	Val	Ala	Val	Gln	Thr	Trp	Leu	Ser	Val	Gly	Leu	
		50					55					60					
15																	
	Phe	Ile	Val	Ala	His	Asp	Ala	Met	Tyr	Gly	Ser	Leu	Ala	Pro	Gly	Arg	
	65					70					75					80	
20																	
	Pro	Arg	Leu	Asn	Ala	Ala	Val	Gly	Arg	Leu	Thr	Leu	Gly	Leu	Tyr	Ala	
				85						90					95		
25																	
	Gly	Phe	Arg	Phe	Asp	Arg	Leu	Lys	Thr	Ala	His	His	Ala	His	His	Ala	
				100					105					110			
30																	
	Ala	Pro	Gly	Thr	Ala	Asp	Asp	Pro	Asp	Phe	His	Ala	Pro	Ala	Pro	Arg	
			115					120					125				
35																	
	Ala	Phe	Leu	Pro	Trp	Phe	Leu	Asn	Phe	Phe	Arg	Thr	Tyr	Phe	Gly	Trp	
		130					135					140					
40																	
	Arg	Glu	Met	Ala	Val	Leu	Thr	Ala	Leu	Val	Leu	Ile	Ala	Leu	Phe	Gly	
	145					150					155					160	
45																	
	Leu	Gly	Ala	Arg	Pro	Ala	Asn	Leu	Leu	Thr	Phe	Trp	Ala	Ala	Pro	Ala	
				165						170					175		
50																	
	Leu	Leu	Ser	Ala	Leu	Gln	Leu	Phe	Thr	Phe	Gly	Thr	Trp	Leu	Pro	His	
				180					185					190			
55																	
	Arg	His	Thr	Asp	Gln	Pro	Phe	Ala	Asp	Ala	His	His	Ala	Arg	Ser	Ser	
			195					200					205				



## 104

Gly Tyr Gly Pro Val Leu Ser Leu Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Arg  
 210 215 220

5 His His Glu His His Leu Ser Pro Trp Arg Pro Trp Trp Arg Leu Trp  
 225 230 235 240

Arg Gly Glu Ser

10

<210> 87

15 <211> 690

<212> DNA

<213> Nodularia spumigena NSOR10

20

<220>

25 <221> CDS

<222> (1) .. (690)

<223>

30

<400> 87

35 atg gcg atc gcc att att agt ata tgg gct atc agc cta ggt ttg tta 48  
 Met Ala Ile Ala Ile Ile Ser Ile Trp Ala Ile Ser Leu Gly Leu Leu  
 1 5 10 15

40 ctt tat att gat ata tcc caa ttc aag ttt tgg atg ttg tta ccg ctc 96  
 Leu Tyr Ile Asp Ile Ser Gln Phe Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Leu  
 20 25 30

45 ata ttt tgg caa aca ttt tta tat acg gga tta ttt att aca gct cat 144  
 Ile Phe Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His  
 35 40 45

gat gcc atg cat ggg gta gtt ttt ccc aaa aat ccc aaa atc aac cat 192  
 Asp Ala Met His Gly Val Val Phe Pro Lys Asn Pro Lys Ile Asn His  
 50 55 60

50 ttc att ggc tca ttg tgc ctg ttt ctt tat ggt ctt tta cct tat caa 240

## 105

[illegible]

&lt;213&gt; Nodularia spumigena NSOR10

5 &lt;400&gt; 88

Met Ala Ile Ala Ile Ile Ser Ile Trp Ala Ile Ser Leu Gly Leu Leu  
 1 5 10 15

10

Leu Tyr Ile Asp Ile Ser Gln Phe Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Leu  
 20 25 30

15

Ile Phe Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His  
 35 40 45

20

Asp Ala Met His Gly Val Val Phe Pro Lys Asn Pro Lys Ile Asn His  
 50 55 60

25

Phe Ile Gly Ser Leu Cys Leu Phe Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln  
 65 70 75 80

Lys Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His His Asn Pro Ala Ser Glu  
 85 90 95

30

Thr Asp Pro Asp Phe His Asn Gly Lys Gln Lys Asn Phe Phe Ala Trp  
 100 105 110

35

Tyr Leu Tyr Phe Met Lys Arg Tyr Trp Ser Trp Leu Gln Ile Ile Thr  
 115 120 125

40

Leu Met Ile Ile Tyr Asn Leu Leu Lys Tyr Ile Trp His Phe Pro Glu  
 130 135 140

45

Asp Asn Met Thr Tyr Phe Trp Val Val Pro Ser Ile Leu Ser Ser Leu  
 145 150 155 160

Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Val Glu  
 165 170 175

50

Gly Tyr Lys Glu Pro His Arg Ser Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp  
 180 185 190

5 Trp Ser Phe Ile Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Tyr Glu His His  
 195 200 205

10 Glu Tyr Pro His Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Met  
 210 215 220

Ser Lys Ser Asn Leu  
 225

15

<210> 89

<211> 789

20

<212> DNA

<213> Nostoc punctiforme ATCC 29133

25

<220>

<221> CDS

30

<222> (1) .. (789)

<223>

35

<400> 89

ttg aat ttt tgt gat aaa cca gtt agc tat tat gtt gca ata gag caa 48

Leu Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln

40

1 5 10 15

tta agt gct aaa gaa gat act gtt tgg ggg ctg gtg att gtc ata gta 96

Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val

20

25

30

45

att att agt ctt tgg gta gct agt ttg gct ttt tta cta gct att aat 144

Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn

35

40

45

50

tat gcc aaa gtc cca att tgg ttg ata cct att gca ata gtt tgg caa 192

## 108

	Tyr	Ala	Lys	Val	Pro	Ile	Trp	Leu	Ile	Pro	Ile	Ala	Ile	Val	Trp	Gln	
	50						55					60					
5	atg	ttc	ctt	tat	aca	ggg	cta	ttt	att	act	gca	cat	gat	gct	atg	cat	240
	Met	Phe	Leu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Phe	Ile	Thr	Ala	His	Asp	Ala	Met	His	
	65					70				75					80		
10	ggg	tca	gtt	tat	cgt	aaa	aat	ccc	aaa	att	aat	aat	ttt	atc	ggg	tca	288
	Gly	Ser	Val	Tyr	Arg	Lys	Asn	Pro	Lys	Ile	Asn	Asn	Phe	Ile	Gly	Ser	
					85					90					95		
15	cta	gct	gta	gcg	ctt	tac	gct	gtg	ttt	cca	tat	caa	cag	atg	tta	aag	336
	Leu	Ala	Val	Ala	Leu	Tyr	Ala	Val	Phe	Pro	Tyr	Gln	Gln	Met	Leu	Lys	
				100					105					110			
	aat	cat	tgc	tta	cat	cat	cgt	cat	cct	gct	agc	gaa	gtt	gac	cca	gat	384
	Asn	His	Cys	Leu	His	His	Arg	His	Pro	Ala	Ser	Glu	Val	Asp	Pro	Asp	
			115					120						125			
20	ttt	cat	gat	ggg	aag	aga	aca	aac	gct	att	ttc	tgg	tat	ctc	cat	ttc	432
	Phe	His	Asp	Gly	Lys	Arg	Thr	Asn	Ala	Ile	Phe	Trp	Tyr	Leu	His	Phe	
		130					135					140					
25	atg	ata	gaa	tac	tcc	agt	tgg	caa	cag	tta	ata	gta	cta	act	atc	cta	480
	Met	Ile	Glu	Tyr	Ser	Ser	Trp	Gln	Gln	Leu	Ile	Val	Leu	Thr	Ile	Leu	
	145					150					155					160	
30	ttt	aat	tta	gct	aaa	tac	gtt	ttg	cac	atc	cat	caa	ata	aat	ctc	atc	528
	Phe	Asn	Leu	Ala	Lys	Tyr	Val	Leu	His	Ile	His	Gln	Ile	Asn	Leu	Ile	
					165					170					175		
35	tta	ttt	tgg	agt	att	cct	cca	att	tta	agt	tcc	att	caa	ctg	ttt	tat	576
	Leu	Phe	Trp	Ser	Ile	Pro	Pro	Ile	Leu	Ser	Ser	Ile	Gln	Leu	Phe	Tyr	
				180					185					190			
	ttc	gga	aca	ttt	ttg	cct	cat	cga	gaa	ccc	aag	aaa	gga	tat	gtt	tat	624
	Phe	Gly	Thr	Phe	Leu	Pro	His	Arg	Glu	Pro	Lys	Lys	Gly	Tyr	Val	Tyr	
			195					200					205				
40	ccc	cat	tgc	agc	caa	aca	ata	aaa	ttg	cca	act	ttt	ttg	tca	ttt	atc	672
	Pro	His	Cys	Ser	Gln	Thr	Ile	Lys	Leu	Pro	Thr	Phe	Leu	Ser	Phe	Ile	
		210					215					220					
45	gct	tgc	tac	cac	ttt	ggg	tat	cat	gaa	gaa	cat	cat	gag	tat	ccc	cat	720
	Ala	Cys	Tyr	His	Phe	Gly	Tyr	His	Glu	Glu	His	His	Glu	Tyr	Pro	His	
	225					230					235					240	
50	gta	cct	tgg	tgg	caa	ctt	cca	tct	gta	tat	aag	cag	aga	gta	ttc	aac	768
	Val	Pro	Trp	Trp	Gln	Leu	Pro	Ser	Val	Tyr	Lys	Gln	Arg	Val	Phe	Asn	
					245					250					255		

aat tca gta acc aat tcg taa  
 Asn Ser Val Thr Asn Ser  
 260

5

<210> 90

<211> 262

10

<212> PRT

<213> Nostoc punctiforme ATCC 29133

15

<400> 90

20 Leu Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln  
 1 5 10 15

Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val  
 20 25 30

25

Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn  
 35 40 45

30

Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln  
 50 55 60

35

Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His  
 65 70 75 80

40

Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser  
 85 90 95

Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys  
 100 105 110

45

Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Glu Val Asp Pro Asp  
 115 120 125

50

## 110

Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe  
130 135 140

5 Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu  
145 150 155 160

10 Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile  
165 170 175

15 Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr  
180 185 190

Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr  
195 200 205

20 Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile  
210 215 220

25 Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His  
225 230 235 240

30 Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn  
245 250 255

35 Asn Ser Val Thr Asn Ser  
260

<210> 91

<211> 762

40 <212> DNA

<213> Nostoc punctiforme ATCC 29133

45 <220>

<221> CDS

50

**<223>**

5

<400> 91

10	gtg atc cag tta gaa caa cca ctc agt cat caa gca aaa ctg act cca	48
	Val Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln Ala Lys Leu Thr Pro	
15	gta ctg aga agt aaa tct cag ttt aag ggg ctt ttc att gct att gtc	96
	Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu Phe Ile Ala Ile Val	
20	att gtt agc gca tgg gtc att agc ctg agt tta tta ctt tcc ctt gac	144
	Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu Leu Leu Ser Leu Asp	
25	atc tca aag cta aaa ttt tgg atg tta ttg cct gtt ata cta tgg caa	192
	Ile Ser Lys Leu Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Val Ile Leu Trp Gln	
30	aca ttt tta tat acg gga tta ttt att aca tct cat gat gcc atg cat	240
	Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser His Asp Ala Met His	
35	ggc gta gta ttt ccc caa aac acc aag att aat cat ttg att gga aca	288
	Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn His Leu Ile Gly Thr	
40	ttg acc cta tcc ctt tat ggt ctt tta cca tat caa aaa cta ttg aaa	336
	Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys	
45	aaa cat tgg tta cac cac cac aat cca gca agc tca ata gac ccg gat	384
	Lys His Trp Leu His His His Asn Pro Ala Ser Ser Ile Asp Pro Asp	
50	ttt cac aat ggt aaa cac caa agt ttc ttt gct tgg tat ttt cat ttt	432
	Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala Trp Tyr Phe His Phe	
55	atg aaa ggt tac tgg agt tgg ggg caa ata att gcg ttg act att att	480
	Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala Leu Thr Ile Ile	
60	tat aac ttt gct aaa tac ata ctc cat atc cca agt gat aat cta act	528
	Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser Asp Asn Leu Thr	



tac ttt tgg gtg cta ccc tcg ctt tta agt tca tta caa tta ttc tat 576  
 Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr  
 180 185 190

5

ttt ggt act ttt tta ccc cat agt gaa cca ata ggg ggt tat gtt cag 624  
 Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly Gly Tyr Val Gln  
 195 200 205

10

cct cat tgt gcc caa aca att agc cgt cct att tgg tgg tca ttt atc 672  
 Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile  
 210 215 220

15

acg tgc tat cat ttt ggc tac cac gag gaa cat cac gaa tat cct cat 720  
 Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His  
 225 230 235 240

20

att tct tgg tgg cag tta cca gaa att tac aaa gca aaa tag 762  
 Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala Lys  
 245 250

<210> 92

25

<211> 253

<212> PRT

<213> Nostoc punctiforme ATCC 29133

30

<400> 92

35

Val Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln Ala Lys Leu Thr Pro  
 1 5 10 15

40

Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu Phe Ile Ala Ile Val  
 20 25 30

45

Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu Leu Ser Leu Asp  
 35 40 45

Ile Ser Lys Leu Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Val Ile Leu Trp Gln  
 50 55 60

50

## 113

Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser His Asp Ala Met His  
65 70 75 80

5 Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn His Leu Ile Gly Thr  
85 90 95

Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys  
10 100 105 110

15 Lys His Trp Leu His His His Asn Pro Ala Ser Ser Ile Asp Pro Asp  
115 120 125

Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala Trp Tyr Phe His Phe  
130 135 140

20 Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala Leu Thr Ile Ile  
145 150 155 160

25 Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser Asp Asn Leu Thr  
165 170 175

30 Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr  
180 185 190

Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly Gly Tyr Val Gln  
195 200 205

Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile  
210 215 220

40            Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His  
               225                          230                          235                          240

45 Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala Lys  
245 250

50                    <210>    93

&lt;211&gt; 1536

&lt;212&gt; DNA

5 &lt;213&gt; Deinococcus radiodurans R1

&lt;220&gt;

10

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1536)

15 &lt;223&gt;

&lt;400&gt; 93

20 atg ccg gat tac gac ctg atc gtc atg ggc gcg ggc cac aac gcg ctg 48  
 Met Pro Asp Tyr Asp Leu Ile Val Met Gly Ala Gly His Asn Ala Leu  
 1 5 10 15

25 gtg act gct gcc tac gcc gcc cgg gcg ggc ctg aaa gtc ggc gtg ttc 96  
 Val Thr Ala Ala Tyr Ala Ala Arg Ala Gly Leu Lys Val Gly Val Phe  
 20 25 30

30 gag cgg cgg cac ctc gtc ggc ggg gcg gtc agc acc gag gag gtc gtg 144  
 Glu Arg Arg His Leu Val Gly Gly Ala Val Ser Thr Glu Glu Val Val  
 35 40 45

35 ccc ggt tac cgc ttc gac tac ggc ggc agc gcc cac atc ctg att cgg 192  
 Pro Gly Tyr Arg Phe Asp Tyr Gly Gly Ser Ala His Ile Leu Ile Arg  
 50 55 60

atg acg ccc atc gtg cgc gaa ctc gaa ctc acg cgg cac ggg ctg cat 240  
 Met Thr Pro Ile Val Arg Glu Leu Glu Leu Thr Arg His Gly Leu His  
 65 70 75 80

40 tac ctc gaa gtg gac cct atg ttt cac gct tcc gac ggt gaa acg ccc 288  
 Tyr Leu Glu Val Asp Pro Met Phe His Ala Ser Asp Gly Glu Thr Pro  
 85 90 95

45 tgg ttc att cac cgc gac gcc ggg cgg acc atc cgc gaa ctg gac gaa 336  
 Trp Phe Ile His Arg Asp Ala Gly Arg Thr Ile Arg Glu Leu Asp Glu  
 100 105 110

50 aag ttt ccc ggg cag ggc gac gcc tac ggg cgc ttt ctc gac gat tgg 384  
 Lys Phe Pro Gly Gln Gly Asp Ala Tyr Gly Arg Phe Leu Asp Asp Trp  
 115 120 125

	aca ccc ttc gcg cgc gcc gtg gcc gac ctg ttc aac tcg gcg ccg ggg	432
	Thr Pro Phe Ala Arg Ala Val Ala Asp Leu Phe Asn Ser Ala Pro Gly	
	130 135 140	
5	ccg ctc gac ctg ggc aaa atg gtg atg cgc agc ggc cag ggc aag gac	480
	Pro Leu Asp Leu Gly Lys Met Val Met Arg Ser Gly Gln Gly Lys Asp	
	145 150 155 160	
10	tgg aac gag cag ctc ccg cgc atc ctg cgg ccc tac ggc gac gtg gcg	528
	Trp Asn Glu Gln Leu Pro Arg Ile Leu Arg Pro Tyr Gly Asp Val Ala	
	165 170 175	
	cgc gag tac ttc agc gag gag cgc gtg cgg gct ccc ctg acc tgg atg	576
15	Arg Glu Tyr Phe Ser Glu Glu Arg Val Arg Ala Pro Leu Thr Trp Met	
	180 185 190	
	gcg gcc cag agc ggc ccc cca ccc tcg gac ccg ctg agc gcg ccc ttt	624
	Ala Ala Gln Ser Gly Pro Pro Pro Ser Asp Pro Leu Ser Ala Pro Phe	
20	195 200 205	
	ttg ctg tgg cac ccg ctc tac cac gaa ggc ggc gtg gcg cgg ccc aaa	672
	Leu Leu Trp His Pro Leu Tyr His Glu Gly Gly Val Ala Arg Pro Lys	
	210 215 220	
25	ggc ggc agc ggc ggc ctg acc aaa gcc ctg cgc cgg gcc acc gag gcc	720
	Gly Gly Ser Gly Gly Leu Thr Lys Ala Leu Arg Arg Ala Thr Glu Ala	
	225 230 235 240	
30	gaa ggc ggc gag gtc ttc acc gac gcg ccg gtc aag gaa att ctg gtc	768
	Glu Gly Gly Glu Val Phe Thr Asp Ala Pro Val Lys Glu Ile Leu Val	
	245 250 255	
	aag gac ggc aag gcg cag ggc atc cgg ctg gaa agc ggc gag acg tac	816
35	Lys Asp Gly Lys Ala Gln Gly Ile Arg Leu Glu Ser Gly Glu Thr Tyr	
	260 265 270	
	acc gcc cgc gcc gtc gtg tcg ggc gtc cac atc ctg acc act gcg aat	864
	Thr Ala Arg Ala Val Val Ser Gly Val His Ile Leu Thr Thr Ala Asn	
40	275 280 285	
	gcc ctg ccc gcc gaa tat gtc cct agc gcc gcc agg aat gtg cgc gtg	912
	Ala Leu Pro Ala Glu Tyr Val Pro Ser Ala Ala Arg Asn Val Arg Val	
	290 295 300	
45	ggc aac ggc ttc ggc atg att ttg cgc ctc gcc ctc agt gaa aaa gtc	960
	Gly Asn Gly Phe Gly Met Ile Leu Arg Leu Ala Leu Ser Glu Lys Val	
	305 310 315 320	
50	aaa tac cgt cac cac acc gag ccc gac tca cgc atc ggc ctg gga ttg	1008

## 116

	Lys	Tyr	Arg	His	His	Thr	Glu	Pro	Asp	Ser	Arg	Ile	Gly	Leu	Gly	Leu	
					325					330					335		
5	ctg	atc	aaa	aac	gag	cgg	caa	atc	atg	cag	ggc	tac	ggc	gaa	tac	ctc	1056
	Leu	Ile	Lys	Asn	Glu	Arg	Gln	Ile	Met	Gln	Gly	Tyr	Gly	Glu	Tyr	Leu	
				340					345					350			
10	gcc	ggg	cag	ccc	acc	acc	gac	ccg	ccc	ctc	gtc	gcc	atg	agc	ttc	agc	1104
	Ala	Gly	Gln	Pro	Thr	Thr	Asp	Pro	Pro	Leu	Val	Ala	Met	Ser	Phe	Ser	
				355					360					365			
15	gcg	gtg	gac	gac	tcg	ctc	gcc	cca	ccg	aac	ggc	gac	gtg	ttg	tgg	ctg	1152
	Ala	Val	Asp	Asp	Ser	Leu	Ala	Pro	Pro	Asn	Gly	Asp	Val	Leu	Trp	Leu	
				370				375					380				
20	tgg	gcg	cag	tac	tac	ccc	ttc	gag	ctc	gcc	acc	ggg	agc	tgg	gaa	acg	1200
	Trp	Ala	Gln	Tyr	Tyr	Pro	Phe	Glu	Leu	Ala	Thr	Gly	Ser	Trp	Glu	Thr	
				385			390				395				400		
25	cgc	acc	gcc	gaa	gcg	cgg	gag	aac	atc	ctg	cgg	gcc	ttt	gag	cac	tac	1248
	Arg	Thr	Ala	Glu	Ala	Arg	Glu	Asn	Ile	Leu	Arg	Ala	Phe	Glu	His	Tyr	
				405					410					415			
30	gcg	ccg	ggc	acc	cgc	gac	acg	att	gtg	ggc	gaa	ctc	gtg	cag	acg	ccg	1296
	Ala	Pro	Gly	Thr	Arg	Asp	Thr	Ile	Val	Gly	Glu	Leu	Val	Gln	Thr	Pro	
				420					425					430			
35	cag	tgg	ctg	gaa	acc	aac	ctc	ggc	ctg	cac	cgg	ggc	aac	gtg	atg	cac	1344
	Gln	Trp	Leu	Glu	Thr	Asn	Leu	Gly	Leu	His	Arg	Gly	Asn	Val	Met	His	
				435				440					445				
40	ctg	gaa	atg	tcc	ttc	gac	cag	atg	ttc	tcc	ttc	cgc	ccc	tgg	ctg	aaa	1392
	Leu	Glu	Met	Ser	Phe	Asp	Gln	Met	Phe	Ser	Phe	Arg	Pro	Trp	Leu	Lys	
				450				455				460					
45	gcg	agc	cag	tac	cgc	tgg	ccg	ggc	gtg	cag	ggg	ctg	tac	ctc	acc	ggc	1440
	Ala	Ser	Gln	Tyr	Arg	Trp	Pro	Gly	Val	Gln	Gly	Leu	Tyr	Leu	Thr	Gly	
				465				470				475			480		
50	gcc	agc	acc	cac	ccc	ggc	gga	ggc	atc	atg	ggc	gcc	tcg	gga	cgc	aac	1488
	Ala	Ser	Thr	His	Pro	Gly	Gly	Gly	Ile	Met	Gly	Ala	Ser	Gly	Arg	Asn	
				485					490					495			
55	gcg	gcg	cgg	gtc	atc	gtg	aag	gac	ctg	acg	cgg	agg	cgc	tgg	aaa	tga	1536
	Ala	Ala	Arg	Val	Ile	Val	Lys	Asp	Leu	Thr	Arg	Arg	Arg	Trp	Lys		
				500					505					510			

&lt;210&gt; 94

&lt;211&gt; 511

&lt;212&gt; PRT

5 &lt;213&gt; Deinococcus radiodurans R1

&lt;400&gt; 94

10

Met Pro Asp Tyr Asp Leu Ile Val Met Gly Ala Gly His Asn Ala Leu  
 1 5 10 15

15

Val Thr Ala Ala Tyr Ala Ala Arg Ala Gly Leu Lys Val Gly Val Phe  
 20 25 30

20

Glu Arg Arg His Leu Val Gly Gly Ala Val Ser Thr Glu Glu Val Val  
 35 40 45

25

Pro Gly Tyr Arg Phe Asp Tyr Gly Gly Ser Ala His Ile Leu Ile Arg  
 50 55 60

30

Met Thr Pro Ile Val Arg Glu Leu Glu Leu Thr Arg His Gly Leu His  
 65 70 75 80

Tyr Leu Glu Val Asp Pro Met Phe His Ala Ser Asp Gly Glu Thr Pro  
 85 90 95

35

Trp Phe Ile His Arg Asp Ala Gly Arg Thr Ile Arg Glu Leu Asp Glu  
 100 105 110

40

Lys Phe Pro Gly Gln Gly Asp Ala Tyr Gly Arg Phe Leu Asp Asp Trp  
 115 120 125

45

Thr Pro Phe Ala Arg Ala Val Ala Asp Leu Phe Asn Ser Ala Pro Gly  
 130 135 140

Pro Leu Asp Leu Gly Lys Met Val Met Arg Ser Gly Gln Gly Lys Asp  
 145 150 155 160

50

## 118

	Trp	Asn	Glu	Gln	Leu	Pro	Arg	Ile	Leu	Arg	Pro	Tyr	Gly	Asp	Val	Ala	
					165					170					175		
5	Arg	Glu	Tyr	Phe	Ser	Glu	Glu	Arg	Val	Arg	Ala	Pro	Leu	Thr	Trp	Met	
				180					185					190			
10	Ala	Ala	Gln	Ser	Gly	Pro	Pro	Pro	Ser	Asp	Pro	Leu	Ser	Ala	Pro	Phe	
			195					200					205				
15	Leu	Leu	Trp	His	Pro	Leu	Tyr	His	Glu	Gly	Gly	Val	Ala	Arg	Pro	Lys	
		210					215					220					
20	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Leu	Thr	Lys	Ala	Leu	Arg	Arg	Ala	Thr	Glu	Ala	
	225					230					235				240		
25	Glu	Gly	Gly	Glu	Val	Phe	Thr	Asp	Ala	Pro	Val	Lys	Glu	Ile	Leu	Val	
				245						250				255			
30	Lys	Asp	Gly	Lys	Ala	Gln	Gly	Ile	Arg	Leu	Glu	Ser	Gly	Glu	Thr	Tyr	
				260					265					270			
35	Thr	Ala	Arg	Ala	Val	Val	Ser	Gly	Val	His	Ile	Leu	Thr	Thr	Ala	Asn	
		275						280					285				
40	Ala	Leu	Pro	Ala	Glu	Tyr	Val	Pro	Ser	Ala	Ala	Arg	Asn	Val	Arg	Val	
		290					295					300					
45	Gly	Asn	Gly	Phe	Gly	Met	Ile	Leu	Arg	Leu	Ala	Leu	Ser	Glu	Lys	Val	
	305					310					315				320		
50	Lys	Tyr	Arg	His	His	Thr	Glu	Pro	Asp	Ser	Arg	Ile	Gly	Leu	Gly	Leu	
				325					330				335				
55	Leu	Ile	Lys	Asn	Glu	Arg	Gln	Ile	Met	Gln	Gly	Tyr	Gly	Glu	Tyr	Leu	
			340					345					350				
60	Ala	Gly	Gln	Pro	Thr	Thr	Asp	Pro	Pro	Leu	Val	Ala	Met	Ser	Phe	Ser	
		355						360				365					

Ala Val Asp Asp Ser Leu Ala Pro Pro Asn Gly Asp Val Leu Trp Leu  
370 375 380

5

Trp Ala Gln Tyr Tyr Pro Phe Glu Leu Ala Thr Gly Ser Trp Glu Thr  
385 390 395 400

10

Arg Thr Ala Glu Ala Arg Glu Asn Ile Leu Arg Ala Phe Glu His Tyr  
405 410 415

15

Ala Pro Gly Thr Arg Asp Thr Ile Val Gly Glu Leu Val Gln Thr Pro  
420 425 430

20

Gln Trp Leu Glu Thr Asn Leu Gly Leu His Arg Gly Asn Val Met His  
435 440 445

25

Leu Glu Met Ser Phe Asp Gln Met Phe Ser Phe Arg Pro Trp Leu Lys  
450 455 460

30

Ala Ser Gln Tyr Arg Trp Pro Gly Val Gln Gly Leu Tyr Leu Thr Gly  
465 470 475 480

Ala Ser Thr His Pro Gly Gly Gly Ile Met Gly Ala Ser Gly Arg Asn  
485 490 495

35

Ala Ala Arg Val Ile Val Lys Asp Leu Thr Arg Arg Arg Trp Lys  
500 505 510

40

<210> 95

<211> 1666

<212> DNA

45

<213> Lycopersicon esculentum

50

**<220>**



&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1494)

5 &lt;223&gt;

&lt;400&gt; 95

10	atg gaa gct ctt ctc aag cct ttt cca tct ctt tta ctt tcc tct cct	48
	Met Glu Ala Leu Leu Lys Pro Phe Pro Ser Leu Leu Leu Ser Ser Pro	
	1 5 10 15	
15	aca ccc cat agg tct att ttc caa caa aat ccc tct ttt cta agt ccc	96
	Thr Pro His Arg Ser Ile Phe Gln Gln Asn Pro Ser Phe Leu Ser Pro	
	20 25 30	
20	acc acc aaa aaa aaa tca aga aaa tgt ctt ctt aga aac aaa agt agt	144
	Thr Thr Lys Lys Lys Ser Arg Lys Cys Leu Leu Arg Asn Lys Ser Ser	
	35 40 45	
25	aaa ctt ttt tgt agc ttt ctt gat tta gca ccc aca tca aag cca gag	192
	Lys Leu Phe Cys Ser Phe Leu Asp Leu Ala Pro Thr Ser Lys Pro Glu	
	50 55 60	
30	tct tta gat gtt aac atc tca tgg gtt gat cct aat tcg aat cgg gct	240
	Ser Leu Asp Val Asn Ile Ser Trp Val Asp Pro Asn Ser Asn Arg Ala	
	65 70 75 80	
35	caa ttc gac gtg atc att atc gga gct ggc cct gct ggg ctc agg cta	288
	Gln Phe Asp Val Ile Ile Ile Gly Ala Gly Pro Ala Gly Leu Arg Leu	
	85 90 95	
40	gct gaa caa gtt tct aaa tat ggt att aag gta tgt tgt gtt gac cct	336
	Ala Glu Gln Val Ser Lys Tyr Gly Ile Lys Val Cys Cys Val Asp Pro	
	100 105 110	
45	tca cca ctc tcc atg tgg cca aat aat tat ggt gtt tgg gtt gat gag	384
	Ser Pro Leu Ser Met Trp Pro Asn Asn Tyr Gly Val Trp Val Asp Glu	
	115 120 125	
50	ttt gag aat tta gga ctg gaa aat tgt tta gat cat aaa tgg cct atg	432
	Phe Glu Asn Leu Gly Leu Glu Asn Cys Leu Asp His Lys Trp Pro Met	
	130 135 140	
55	act tgt gtg cat ata aat gat aac aaa act aag tat ttg gga aga cca	480
	Thr Cys Val His Ile Asn Asp Asn Lys Thr Lys Tyr Leu Gly Arg Pro	
	145 150 155 160	
60	tat ggt aga gtt agt aga aag aag ctg aag ttg aaa ttg ttg aat agt	528

## 121

	Tyr	Gly	Arg	Val	Ser	Arg	Lys	Lys	Leu	Lys	Leu	Lys	Leu	Leu	Asn	Ser	
					165				170						175		
5	tgt	gtt	gag	aac	aga	gtg	aag	ttt	tat	aaa	gct	aag	gtt	tgg	aaa	gtg	576
	Cys	Val	Glu	Asn	Arg	Val	Lys	Phe	Tyr	Lys	Ala	Lys	Val	Trp	Lys	Val	
				180				185					190				
10	gaa	cat	gaa	gaa	ttt	gag	tct	tca	att	gtt	tgt	gat	gat	ggg	aag	aag	624
	Glu	His	Glu	Glu	Phe	Glu	Ser	Ser	Ile	Val	Cys	Asp	Asp	Gly	Lys	Lys	
			195				200					205					
15	ata	aga	ggg	agt	ttg	gtt	gtg	gat	gca	agt	ggg	ttt	gct	agt	gat	ttt	672
	Ile	Arg	Gly	Ser	Leu	Val	Val	Asp	Ala	Ser	Gly	Phe	Ala	Ser	Asp	Phe	
		210					215					220					
	ata	gag	tat	gac	agg	cca	aga	aac	cat	ggg	tat	caa	att	gct	cat	ggg	720
	Ile	Glu	Tyr	Asp	Arg	Pro	Arg	Asn	His	Gly	Tyr	Gln	Ile	Ala	His	Gly	
	225				230					235			240				
20	gtt	tta	gta	gaa	gtt	gat	aat	cat	cca	ttt	gat	ttg	gat	aaa	atg	gtg	768
	Val	Leu	Val	Glu	Val	Asp	Asn	His	Pro	Phe	Asp	Leu	Asp	Lys	Met	Val	
				245					250				255				
25	ctt	atg	gat	tgg	agg	gat	tct	cat	ttg	ggg	aat	gag	cca	tat	tta	agg	816
	Leu	Met	Asp	Trp	Arg	Asp	Ser	His	Leu	Gly	Asn	Glu	Pro	Tyr	Leu	Arg	
			260					265					270				
30	gtg	aat	aat	gct	aaa	gaa	cca	aca	ttc	ttg	tat	gca	atg	cca	ttt	gat	864
	Val	Asn	Asn	Ala	Lys	Glu	Pro	Thr	Phe	Leu	Tyr	Ala	Met	Pro	Phe	Asp	
		275					280					285					
35	aga	gat	ttg	gtt	ttc	ttg	gaa	gag	act	tct	ttg	gtg	agt	cgt	cct	gtt	912
	Arg	Asp	Leu	Val	Phe	Leu	Glu	Glu	Thr	Ser	Leu	Val	Ser	Arg	Pro	Val	
		290				295					300						
	tta	tcg	tat	atg	gaa	gta	aaa	aga	agg	atg	gtg	gca	aga	tta	agg	cat	960
	Leu	Ser	Tyr	Met	Glu	Val	Lys	Arg	Arg	Met	Val	Ala	Arg	Leu	Arg	His	
	305				310				315				320				
40	ttg	ggg	atc	aaa	gtg	aaa	agt	gtt	att	gag	gaa	gag	aaa	tgt	gtg	atc	1008
	Leu	Gly	Ile	Lys	Val	Lys	Ser	Val	Ile	Glu	Glu	Glu	Lys	Cys	Val	Ile	
				325				330					335				
45	cct	atg	gga	gga	cca	ctt	ccg	cgg	att	cct	caa	aat	gtt	atg	gct	att	1056
	Pro	Met	Gly	Gly	Pro	Leu	Pro	Arg	Ile	Pro	Gln	Asn	Val	Met	Ala	Ile	
			340					345					350				
50	ggg	ggg	aat	tca	ggg	ata	gtt	cat	cca	tca	aca	ggg	tac	atg	gtg	gct	1104
	Gly	Gly	Asn	Ser	Gly	Ile	Val	His	Pro	Ser	Thr	Gly	Tyr	Met	Val	Ala	
		355					360					365					

50

&lt;213&gt; Lycopersicon esculentum

5 &lt;400&gt; 96

Met Glu Ala Leu Leu Lys Pro Phe Pro Ser Leu Leu Leu Ser Ser Pro  
1 5 10 15

10

Thr Pro His Arg Ser Ile Phe Gln Gln Asn Pro Ser Phe Leu Ser Pro  
20 25 30

15

Thr Thr Lys Lys Lys Ser Arg Lys Cys Leu Leu Arg Asn Lys Ser Ser  
35 40 45

20

Lys Leu Phe Cys Ser Phe Leu Asp Leu Ala Pro Thr Ser Lys Pro Glu  
50 55 60

25

Ser Leu Asp Val Asn Ile Ser Trp Val Asp Pro Asn Ser Asn Arg Ala  
65 70 75 80

30

Gln Phe Asp Val Ile Ile Ile Gly Ala Gly Pro Ala Gly Leu Arg Leu  
85 90 95

Ala Glu Gln Val Ser Lys Tyr Gly Ile Lys Val Cys Cys Val Asp Pro  
100 105 110

35

Ser Pro Leu Ser Met Trp Pro Asn Asn Tyr Gly Val Trp Val Asp Glu  
115 120 125

40

Phe Glu Asn Leu Gly Leu Glu Asn Cys Leu Asp His Lys Trp Pro Met  
130 135 140

45

Thr Cys Val His Ile Asn Asp Asn Lys Thr Lys Tyr Leu Gly Arg Pro  
145 150 155 160

Tyr Gly Arg Val Ser Arg Lys Lys Leu Lys Leu Lys Leu Leu Asn Ser  
165 170 175

50

124

	Cys	Val	Glu	Asn	Arg	Val	Lys	Phe	Tyr	Lys	Ala	Lys	Val	Trp	Lys	Val	
				180					185					190			
5	Glu	His	Glu	Glu	Phe	Glu	Ser	Ser	Ile	Val	Cys	Asp	Asp	Gly	Lys	Lys	
			195					200					205				
10	Ile	Arg	Gly	Ser	Leu	Val	Val	Asp	Ala	Ser	Gly	Phe	Ala	Ser	Asp	Phe	
		210					215					220					
15	Ile	Glu	Tyr	Asp	Arg	Pro	Arg	Asn	His	Gly	Tyr	Gln	Ile	Ala	His	Gly	
	225					230					235					240	
20	Val	Leu	Val	Glu	Val	Asp	Asn	His	Pro	Phe	Asp	Leu	Asp	Lys	Met	Val	
					245					250					255		
25	Val	Asn	Asn	Ala	Lys	Glu	Pro	Thr	Phe	Leu	Tyr	Ala	Met	Pro	Phe	Asp	
			275					280					285				
30	Arg	Asp	Leu	Val	Phe	Leu	Glu	Glu	Thr	Ser	Leu	Val	Ser	Arg	Pro	Val	
		290					295					300					
35	Leu	Ser	Tyr	Met	Glu	Val	Lys	Arg	Arg	Met	Val	Ala	Arg	Leu	Arg	His	
	305					310					315					320	
40	Leu	Gly	Ile	Lys	Val	Lys	Ser	Val	Ile	Glu	Glu	Glu	Lys	Cys	Val	Ile	
					325					330					335		
45	Pro	Met	Gly	Gly	Pro	Leu	Pro	Arg	Ile	Pro	Gln	Asn	Val	Met	Ala	Ile	
			340					345					350				
50	Gly	Gly	Asn	Ser	Gly	Ile	Val	His	Pro	Ser	Thr	Gly	Tyr	Met	Val	Ala	
			355				360						365				
50	Arg	Ser	Met	Ala	Leu	Ala	Pro	Val	Leu	Ala	Glu	Ala	Ile	Val	Glu	Gly	
		370					375					380					

```

Leu Gly Ser Thr Arg Met Ile Arg Gly Ser Gln Leu Tyr His Arg Val
385                      390                      395                      400
5
Trp Asn Gly Leu Trp Pro Leu Asp Arg Arg Cys Val Arg Glu Cys Tyr
                      405                      410                      415
10
Ser Phe Gly Met Glu Thr Leu Leu Lys Leu Asp Leu Lys Gly Thr Arg
                      420                      425                      430
15
Arg Leu Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Asp Pro Lys Tyr Trp Gln Gly
                      435                      440                      445
20
Phe Leu Ser Ser Arg Leu Ser Val Lys Glu Leu Gly Leu Leu Ser Leu
                      450                      455                      460
25
Cys Leu Phe Gly His Gly Ser Asn Met Thr Arg Leu Asp Ile Val Thr
465                      470                      475                      480
30
Lys Cys Pro Leu Pro Leu Val Arg Leu Ile Gly Asn Leu Ala Ile Glu
                      485                      490                      495
35
Ser Leu
40
<210> 97
<211> 1125
<212> DNA
45
<213> Lycopersicon esculentum
50
<220>
<221> CDS
<222> (20) .. (946)
55

```

&lt;223&gt;

5	<400> 97		
	ttgggtcatct ccacaatca atg gct gcc gcc gcc aga atc tcc gcc tcc tct	52	
	Met Ala Ala Ala Ala Arg Ile Ser Ala Ser Ser		
	1 5 10		
10	acc tca cga act ttt tat ttc cgt cat tca ccg ttt ctt ggc cca aaa	100	
	Thr Ser Arg Thr Phe Tyr Phe Arg His Ser Pro Phe Leu Gly Pro Lys		
	15 20 25		
15	cct act tcg aca acc tca cat gtt tct cca atc tct cct ttt tct ctt	148	
	Pro Thr Ser Thr Thr Ser His Val Ser Pro Ile Ser Pro Phe Ser Leu		
	30 35 40		
20	aat cta ggc cca att ttg agg tct aga aga aaa ccc agt ttc act gtt	196	
	Asn Leu Gly Pro Ile Leu Arg Ser Arg Arg Lys Pro Ser Phe Thr Val		
	45 50 55		
25	tgc ttt gtt ctc gag gat gag aag ctg aaa cct caa ttt gac gat gag	244	
	Cys Phe Val Leu Glu Asp Glu Lys Leu Lys Pro Gln Phe Asp Asp Glu		
	60 65 70 75		
30	gct gag gat ttt gaa aag aag att gag gaa cag atc tta gct act cgc	292	
	Ala Glu Asp Phe Glu Lys Lys Ile Glu Glu Gln Ile Leu Ala Thr Arg		
	80 85 90		
35	ttg gcg gag aaa ctg gct agg aag aaa tcg gag agg ttt act tat ctt	340	
	Leu Ala Glu Lys Leu Ala Arg Lys Lys Ser Glu Arg Phe Thr Tyr Leu		
	95 100 105		
40	gtg gct gct ata atg tct agt ttt ggg att act tct atg gct gtt atg	388	
	Val Ala Ala Ile Met Ser Ser Phe Gly Ile Thr Ser Met Ala Val Met		
	110 115 120		
45	gct gtt tat tac aga ttt tcg tgg caa atg gag gga gga gaa gtt cct	436	
	Ala Val Tyr Tyr Arg Phe Ser Trp Gln Met Glu Gly Gly Glu Val Pro		
	125 130 135		
50	gta acc gaa atg ttg ggt aca ttt gct ctc tct gtt ggt gct gct gta	484	
	Val Thr Glu Met Leu Gly Thr Phe Ala Leu Ser Val Gly Ala Ala Val		
	140 145 150 155		
55	gga atg gag ttt tgg gcg aga tgg gca cac aaa gca ctg tgg cat gct	532	
	Gly Met Glu Phe Trp Ala Arg Trp Ala His Lys Ala Leu Trp His Ala		
	160 165 170		
60	tca cta tgg cac atg cat gag tca cac cac aaa cca aga gaa gga cct	580	





&lt;400&gt; 98

5 Met Ala Ala Ala Ala Arg Ile Ser Ala Ser Ser Thr Ser Arg Thr Phe  
 1 5 10 15

10 Tyr Phe Arg His Ser Pro Phe Leu Gly Pro Lys Pro Thr Ser Thr Thr  
 20 25 30

15 Ser His Val Ser Pro Ile Ser Pro Phe Ser Leu Asn Leu Gly Pro Ile  
 35 40 45

20 Leu Arg Ser Arg Arg Lys Pro Ser Phe Thr Val Cys Phe Val Leu Glu  
 50 55 60

25 Asp Glu Lys Leu Lys Pro Gln Phe Asp Asp Glu Ala Glu Asp Phe Glu  
 65 70 75 80

30 Lys Lys Ile Glu Glu Gln Ile Leu Ala Thr Arg Leu Ala Glu Lys Leu  
 85 90 95

35 Ala Arg Lys Lys Ser Glu Arg Phe Thr Tyr Leu Val Ala Ala Ile Met  
 100 105 110

40 Ser Ser Phe Gly Ile Thr Ser Met Ala Val Met Ala Val Tyr Tyr Arg  
 115 120 125

45 Phe Ser Trp Gln Met Glu Gly Gly Glu Val Pro Val Thr Glu Met Leu  
 130 135 140

50 Gly Thr Phe Ala Leu Ser Val Gly Ala Ala Val Gly Met Glu Phe Trp  
 145 150 155 160

55 Ala Arg Trp Ala His Lys Ala Leu Trp His Ala Ser Leu Trp His Met  
 165 170 175

60 His Glu Ser His His Lys Pro Arg Glu Gly Pro Phe Glu Leu Asn Asp  
 180 185 190

Val Phe Ala Ile Thr Asn Ala Val Pro Ala Ile Ala Leu Leu Asn Tyr  
 195 200 205  
 5

Gly Phe Phe His Lys Gly Leu Ile Ala Gly Leu Cys Phe Gly Ala Gly  
 210 215 220  
 10

Leu Gly Ile Thr Val Phe Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly  
 225 230 235 240  
 15

Leu Val His Lys Arg Phe Pro Val Gly Pro Val Ala Asn Val Pro Tyr  
 245 250 255  
 20

Leu Arg Lys Val Ala Ala Ala His Ser Leu His His Ser Glu Lys Phe  
 260 265 270  
 25

Asn Gly Val Pro Tyr Gly Leu Phe Phe Gly Pro Lys Glu Leu Glu Glu  
 275 280 285  
 30

Val Gly Gly Thr Glu Glu Leu Glu Lys Glu Val Ile Arg Arg Thr Arg  
 290 295 300  
 35

Leu Ser Lys Gly Ser  
 305  
 40

<210> 99  
 <211> 1779  
 <212> DNA  
 <213> Arabidopsis thaliana  
 45

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1) .. (1779)  
 50

&lt;223&gt;

5	<400> 99	
	atg gat ctc cgt cgg agg cct cct aaa cca ccg gtt acc aac aac aac	48
	Met Asp Leu Arg Arg Arg Pro Pro Lys Pro Pro Val Thr Asn Asn Asn	
	1 5 10 15	
10	aac tcc aac gga tct ttc cgt tct tat cag cct cgc act tcc gat gac	96
	Asn Ser Asn Gly Ser Phe Arg Ser Tyr Gln Pro Arg Thr Ser Asp Asp	
	20 25 30	
15	gat cat cgt cgc cgg gct aca aca att gct cct cca ccg aaa gca tcc	144
	Asp His Arg Arg Arg Ala Thr Thr Ile Ala Pro Pro Pro Lys Ala Ser	
	35 40 45	
20	gac gcg ctt cct ctt ccg tta tat ctc aca aac gcc gtt ttc ttc acg	192
	Asp Ala Leu Pro Leu Pro Leu Tyr Leu Thr Asn Ala Val Phe Phe Thr	
	50 55 60	
25	ctc ttc ttc tcc gtc gcg tat tac ctc ctc cac ccg tgg cgt gac aag	240
	Leu Phe Phe Ser Val Ala Tyr Tyr Leu Leu His Arg Trp Arg Asp Lys	
	65 70 75 80	
30	atc cgt tac aat acg cct ctt cac gtc gtc act atc aca gaa ctc ggc	288
	Ile Arg Tyr Asn Thr Pro Leu His Val Val Thr Ile Thr Glu Leu Gly	
	85 90 95	
35	gcc att att gct ctc atc gct tcg ttt atc tat ctc cta ggg ttt ttt	336
	Ala Ile Ile Ala Leu Ile Ala Ser Phe Ile Tyr Leu Leu Gly Phe Phe	
	100 105 110	
40	ggc att gac ttt gtt cag tca ttt atc tca ccg gcc tct ggt gat gct	384
	Gly Ile Asp Phe Val Gln Ser Phe Ile Ser Arg Ala Ser Gly Asp Ala	
	115 120 125	
45	tgg gat ctc gcc gat acg atc gat gat gat gac cac cgc ctt gtc acg	432
	Trp Asp Leu Ala Asp Thr Ile Asp Asp Asp Asp His Arg Leu Val Thr	
	130 135 140	
50	tgc tct cca ccg act ccg atc gtt tcc gtt gct aaa tta cct aat ccg	480
	Cys Ser Pro Pro Thr Pro Ile Val Ser Val Ala Lys Leu Pro Asn Pro	
	145 150 155 160	
55	gaa cct att gtt acc gaa tcg ctt cct gag gaa gac gag gag att gtg	528
	Glu Pro Ile Val Thr Glu Ser Leu Pro Glu Glu Asp Glu Glu Ile Val	
	165 170 175	
60	aaa tcg gtt atc gac gga gtt att cca tcg tac tcg ctt gaa tct cgt	576



	gat gtg att gga atc tct ggt aac ttc tgt tcg gac aag aaa cct gct	1200
	Asp Val Ile Gly Ile Ser Gly Asn Phe Cys Ser Asp Lys Lys Pro Ala	
	385 390 395 400	
5	gct gtg aac tgg att gag gga cgt ggt aaa tca gtt gtt tgc gag gct	1248
	Ala Val Asn Trp Ile Glu Gly Arg Gly Lys Ser Val Val Cys Glu Ala	
	405 410 415	
10	gta atc aga gga gag atc gtg aac aag gtc ttg aaa acg agc gtg gct	1296
	Val Ile Arg Gly Glu Ile Val Asn Lys Val Leu Lys Thr Ser Val Ala	
	420 425 430	
15	gct tta gtc gag ctg aac atg ctg aag aac cta gct ggc tct gct gtt	1344
	Ala Leu Val Glu Leu Asn Met Leu Lys Asn Leu Ala Gly Ser Ala Val	
	435 440 445	
20	gca ggc tct cta ggt gga ttc aac gct cat gcc agt aac ata gtg tct	1392
	Ala Gly Ser Leu Gly Gly Phe Asn Ala His Ala Ser Asn Ile Val Ser	
	450 455 460	
25	gct gta ttc ata gct act ggc caa gat cca gct caa aac gtg gag agt	1440
	Ala Val Phe Ile Ala Thr Gly Gln Asp Pro Ala Gln Asn Val Glu Ser	
	465 470 475 480	
	tct caa tgc atc acc atg atg gaa gct att aat gac ggc aaa gat atc	1488
	Ser Gln Cys Ile Thr Met Met Glu Ala Ile Asn Asp Gly Lys Asp Ile	
	485 490 495	
30	cat atc tca gtc act atg cca tct atc gag gtg ggg aca gtg gga gga	1536
	His Ile Ser Val Thr Met Pro Ser Ile Glu Val Gly Thr Val Gly Gly	
	500 505 510	
35	gga aca cag ctt gca tct caa tca gcg tgt tta aac ctg ctg gga gtt	1584
	Gly Thr Gln Leu Ala Ser Gln Ser Ala Cys Leu Asn Leu Leu Gly Val	
	515 520 525	
40	aaa gga gca agc aca gag tcg ccg gga atg aac gca agg agg cta gcg	1632
	Lys Gly Ala Ser Thr Glu Ser Pro Gly Met Asn Ala Arg Arg Leu Ala	
	530 535 540	
45	acg atc gta gcc gga gca gtt tta gct gga gag tta tct tta atg tca	1680
	Thr Ile Val Ala Gly Ala Val Leu Ala Gly Glu Leu Ser Leu Met Ser	
	545 550 555 560	
	gca att gca gct gga cag ctt gtg aga agt cac atg aaa tac aat aga	1728
	Ala Ile Ala Ala Gly Gln Leu Val Arg Ser His Met Lys Tyr Asn Arg	
	565 570 575	
50	tcc agc cga gac atc tct gga gca acg aca acg aca aca aca aca	1776

Ser Ser Arg Asp Ile Ser Gly Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr  
                   580                                  585                                  590

tga

1779

5

&lt;210&gt; 100

&lt;211&gt; 592

10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

15

&lt;400&gt; 100

20

Met Asp Leu Arg Arg Arg Pro Pro Lys Pro Pro Val Thr Asn Asn Asn  
   1                                  5                                  10                                  15

Asn Ser Asn Gly Ser Phe Arg Ser Tyr Gln Pro Arg Thr Ser Asp Asp  
                   20                                  25                                  30

25

Asp His Arg Arg Arg Ala Thr Thr Ile Ala Pro Pro Pro Lys Ala Ser  
                   35                                  40                                  45

30

Asp Ala Leu Pro Leu Pro Leu Tyr Leu Thr Asn Ala Val Phe Phe Thr  
                   50                                  55                                  60

35

Leu Phe Phe Ser Val Ala Tyr Tyr Leu Leu His Arg Trp Arg Asp Lys  
   65                                  70                                  75                                  80

40

Ile Arg Tyr Asn Thr Pro Leu His Val Val Thr Ile Thr Glu Leu Gly  
                   85                                  90                                  95

45

Ala Ile Ile Ala Leu Ile Ala Ser Phe Ile Tyr Leu Leu Gly Phe Phe  
                   100                                  105                                  110

Gly Ile Asp Phe Val Gln Ser Phe Ile Ser Arg Ala Ser Gly Asp Ala  
                   115                                  120                                  125

50

	Trp	Asp	Leu	Ala	Asp	Thr	Ile	Asp	Asp	Asp	Asp	His	Arg	Leu	Val	Thr	
	130						135					140					
5	Cys	Ser	Pro	Pro	Thr	Pro	Ile	Val	Ser	Val	Ala	Lys	Leu	Pro	Asn	Pro	
	145					150					155				160		
10	Glu	Pro	Ile	Val	Thr	Glu	Ser	Leu	Pro	Glu	Glu	Asp	Glu	Glu	Ile	Val	
					165					170					175		
15	Lys	Ser	Val	Ile	Asp	Gly	Val	Ile	Pro	Ser	Tyr	Ser	Leu	Glu	Ser	Arg	
				180					185					190			
20	Leu	Gly	Asp	Cys	Lys	Arg	Ala	Ala	Ser	Ile	Arg	Arg	Glu	Ala	Leu	Gln	
		195						200					205				
25	Arg	Val	Thr	Gly	Arg	Ser	Ile	Glu	Gly	Leu	Pro	Leu	Asp	Gly	Phe	Asp	
	210						215					220					
30	Tyr	Glu	Ser	Ile	Leu	Gly	Gln	Cys	Cys	Glu	Met	Pro	Val	Gly	Tyr	Ile	
	225				230					235					240		
35	Gln	Ile	Pro	Val	Gly	Ile	Ala	Gly	Pro	Leu	Leu	Leu	Asp	Gly	Tyr	Glu	
				245					250					255			
40	Tyr	Ser	Val	Pro	Met	Ala	Thr	Thr	Glu	Gly	Cys	Leu	Val	Ala	Ser	Thr	
			260						265					270			
45	Asn	Arg	Gly	Cys	Lys	Ala	Met	Phe	Ile	Ser	Gly	Gly	Ala	Thr	Ser	Thr	
		275						280					285				
50	Val	Leu	Lys	Asp	Gly	Met	Thr	Arg	Ala	Pro	Val	Val	Arg	Phe	Ala	Ser	
	290						295					300					
55	Ala	Arg	Arg	Ala	Ser	Glu	Leu	Lys	Phe	Phe	Leu	Glu	Asn	Pro	Glu	Asn	
	305				310					315				320			
60	Phe	Asp	Thr	Leu	Ala	Val	Val	Phe	Asn	Arg	Ser	Ser	Arg	Phe	Ala	Arg	
				325					330					335			

5      Leu Gln Ser Val Lys Cys Thr Ile Ala Gly Lys Asn Ala Tyr Val Arg  
                          340                           345                           350

10      Phe Cys Cys Ser Thr Gly Asp Ala Met Gly Met Asn Met Val Ser Lys  
                          355                           360                           365

Gly Val Gln Asn Val Leu Glu Tyr Leu Thr Asp Asp Phe Pro Asp Met  
                          370                           375                           380

15      Asp Val Ile Gly Ile Ser Gly Asn Phe Cys Ser Asp Lys Lys Pro Ala  
                          385                           390                           395                           400

20      Ala Val Asn Trp Ile Glu Gly Arg Gly Lys Ser Val Val Cys Glu Ala  
    405     410     415

25      Val Ile Arg Gly Glu Ile Val Asn Lys Val Leu Lys Thr Ser Val Ala  
    420     425     430

30      Ala Leu Val Glu Leu Asn Met Leu Lys Asn Leu Ala Gly Ser Ala Val  
    435     440     445

35      Ala Gly Ser Leu Gly Gly Phe Asn Ala His Ala Ser Asn Ile Val Ser  
    450     455     460

40      Ser Gln Cys Ile Thr Met Met Glu Ala Ile Asn Asp Gly Lys Asp Ile  
    485     490     495

45      His Ile Ser Val Thr Met Pro Ser Ile Glu Val Gly Thr Val Gly Gly  
    500     505     510

50      Gly Thr Gln Leu Ala Ser Gln Ser Ala Cys Leu Asn Leu Leu Gly Val  
    515     520     525



cca tcg gtg gtg atg gac tcc gat ttc gac gcc aag gtg ttc cgt aag 192

## 137

	Pro	Ser	Val	Val	Met	Asp	Ser	Asp	Phe	Asp	Ala	Lys	Val	Phe	Arg	Lys	
	50						55					60					
5	aac	ttg	acg	aga	agc	gat	aat	tac	aat	cgt	aaa	ggg	ttc	ggg	cat	aag	240
	Asn	Leu	Thr	Arg	Ser	Asp	Asn	Tyr	Asn	Arg	Lys	Gly	Phe	Gly	His	Lys	
	65					70				75					80		
10	gag	gag	aca	ctc	aag	ctc	atg	aat	cga	gag	tac	acc	agt	gat	ata	ttg	288
	Glu	Glu	Thr	Leu	Lys	Leu	Met	Asn	Arg	Glu	Tyr	Thr	Ser	Asp	Ile	Leu	
					85					90					95		
15	gag	aca	ctg	aaa	aca	aat	ggg	tat	act	tat	tct	tgg	gga	gat	gtt	act	336
	Glu	Thr	Leu	Lys	Thr	Asn	Gly	Tyr	Thr	Tyr	Ser	Trp	Gly	Asp	Val	Thr	
				100				105						110			
	gtg	aaa	ctc	gct	aaa	gca	tat	ggg	ttt	tgc	tgg	ggg	gtt	gag	cgt	gct	384
	Val	Lys	Leu	Ala	Lys	Ala	Tyr	Gly	Phe	Cys	Trp	Gly	Val	Glu	Arg	Ala	
			115					120					125				
20	gtt	cag	att	gca	tat	gaa	gca	cga	aag	cag	ttt	cca	gag	gag	agg	ctt	432
	Val	Gln	Ile	Ala	Tyr	Glu	Ala	Arg	Lys	Gln	Phe	Pro	Glu	Glu	Arg	Leu	
		130					135					140					
25	tgg	att	act	aac	gaa	atc	att	cat	aac	ccg	acc	gtc	aat	aag	agg	ttg	480
	Trp	Ile	Thr	Asn	Glu	Ile	Ile	His	Asn	Pro	Thr	Val	Asn	Lys	Arg	Leu	
	145				150					155					160		
30	gaa	gat	atg	gat	gtt	aaa	att	att	ccg	gtt	gag	gat	tca	aag	aaa	cag	528
	Glu	Asp	Met	Asp	Val	Lys	Ile	Ile	Pro	Val	Glu	Asp	Ser	Lys	Lys	Gln	
					165					170					175		
35	ttt	gat	gta	gta	gag	aaa	gat	gat	gtg	gtt	atc	ctt	cct	gcg	ttt	gga	576
	Phe	Asp	Val	Val	Glu	Lys	Asp	Asp	Val	Val	Ile	Leu	Pro	Ala	Phe	Gly	
				180					185					190			
	gct	ggg	gtt	gac	gag	atg	tat	gtt	ctt	aat	gat	aaa	aag	gtg	caa	att	624
	Ala	Gly	Val	Asp	Glu	Met	Tyr	Val	Leu	Asn	Asp	Lys	Lys	Val	Gln	Ile	
			195					200					205				
40	gtt	gac	acg	act	tgt	cct	tgg	gtg	aca	aag	gtc	tgg	aac	acg	gtt	gag	672
	Val	Asp	Thr	Thr	Cys	Pro	Trp	Val	Thr	Lys	Val	Trp	Asn	Thr	Val	Glu	
		210					215					220					
45	aag	cac	aag	aag	ggg	gaa	tac	aca	tca	gta	atc	cat	ggg	aaa	tat	aat	720
	Lys	His	Lys	Lys	Gly	Glu	Tyr	Thr	Ser	Val	Ile	His	Gly	Lys	Tyr	Asn	
	225					230					235				240		
50	cat	gaa	gag	acg	att	gca	act	gcg	tct	ttt	gca	gga	aag	tac	atc	att	768
	His	Glu	Glu	Thr	Ile	Ala	Thr	Ala	Ser	Phe	Ala	Gly	Lys	Tyr	Ile	Ile	
					245					250					255		

	gta aag aac atg aaa gag gca aat tac gtt tgt gat tac att ctc ggt	816
	Val Lys Asn Met Lys Glu Ala Asn Tyr Val Cys Asp Tyr Ile Leu Gly	
	260 265 270	
5	ggc caa tac gat gga tct agc tcc aca aaa gag gag ttc atg gag aaa	864
	Gly Gln Tyr Asp Gly Ser Ser Ser Thr Lys Glu Glu Phe Met Glu Lys	
	275 280 285	
10	ttc aaa tac gca att tcg aag ggt ttc gat ccc gac aat gac ctt gtc	912
	Phe Lys Tyr Ala Ile Ser Lys Gly Phe Asp Pro Asp Asn Asp Leu Val	
	290 295 300	
15	aaa gtt ggt att gca aac caa aca acg atg cta aag gga gaa aca gag	960
	Lys Val Gly Ile Ala Asn Gln Thr Thr Met Leu Lys Gly Glu Thr Glu	
	305 310 315 320	
20	gag ata gga aga tta ctc gag aca aca atg atg cgc aag tat gga gtg	1008
	Glu Ile Gly Arg Leu Leu Glu Thr Thr Met Met Arg Lys Tyr Gly Val	
	325 330 335	
25	gaa aat gta agc gga cat ttc atc agc ttc aac aca ata tgc gac gct	1056
	Glu Asn Val Ser Gly His Phe Ile Ser Phe Asn Thr Ile Cys Asp Ala	
	340 345 350	
30	act caa gag cga caa gac gca atc tat gag cta gtg gaa gag aag att	1104
	Thr Gln Glu Arg Gln Asp Ala Ile Tyr Glu Leu Val Glu Glu Lys Ile	
	355 360 365	
35	gac ctc atg cta gtg gtt ggc gga tgg aat tca agt aac acc tct cac	1152
	Asp Leu Met Leu Val Val Gly Gly Trp Asn Ser Ser Asn Thr Ser His	
	370 375 380	
40	ctt cag gaa atc tca gag gca cgg gga atc cca tct tac tgg atc gat	1200
	Leu Gln Glu Ile Ser Glu Ala Arg Gly Ile Pro Ser Tyr Trp Ile Asp	
	385 390 395 400	
45	agt gag aaa cgg ata gga cct ggg aat aaa ata gcc tat aag ctc cac	1248
	Ser Glu Lys Arg Ile Gly Pro Gly Asn Lys Ile Ala Tyr Lys Leu His	
	405 410 415	
50	tat gga gaa ctg gtc gag aag gaa aac ttt ctc cca aag gga cca ata	1296
	Tyr Gly Glu Leu Val Glu Lys Glu Asn Phe Leu Pro Lys Gly Pro Ile	
	420 425 430	
55	aca atc ggt gtg aca tca ggt gca tca acc ccg gat aag gtc gtg gaa	1344
	Thr Ile Gly Val Thr Ser Gly Ala Ser Thr Pro Asp Lys Val Val Glu	
	435 440 445	
60	gat gct ttg gtg aag gtg ttc gac att aaa cgt gaa gag tta ttg cag	1392

Asp Ala Leu Val Lys Val Phe Asp Ile Lys Arg Glu Glu Leu Leu Gln  
 450 455 460

ctg gct tga

1401

5 Leu Ala  
 465

<210> 102

10

<211> 466

<212> PRT

15 <213> Arabidopsis thaliana ISPH

<400> 102

20

Met Ala Val Ala Leu Gln Phe Ser Arg Leu Cys Val Arg Pro Asp Thr  
 1 5 10 15

25 Phe Val Arg Glu Asn His Leu Ser Gly Ser Gly Ser Leu Arg Arg Arg  
 20 25 30

30 Lys Ala Leu Ser Val Arg Cys Ser Ser Gly Asp Glu Asn Ala Pro Ser  
 35 40 45

Pro Ser Val Val Met Asp Ser Asp Phe Asp Ala Lys Val Phe Arg Lys  
 50 55 60

35

Asn Leu Thr Arg Ser Asp Asn Tyr Asn Arg Lys Gly Phe Gly His Lys  
 65 70 75 80

40

Glu Glu Thr Leu Lys Leu Met Asn Arg Glu Tyr Thr Ser Asp Ile Leu  
 85 90 95

45 Glu Thr Leu Lys Thr Asn Gly Tyr Thr Tyr Ser Trp Gly Asp Val Thr  
 100 105 110

50 Val Lys Leu Ala Lys Ala Tyr Gly Phe Cys Trp Gly Val Glu Arg Ala  
 115 120 125

5 Val Gln Ile Ala Tyr Glu Ala Arg Lys Gln Phe Pro Glu Glu Arg Leu  
 130 135 140

10 Trp Ile Thr Asn Glu Ile Ile His Asn Pro Thr Val Asn Lys Arg Leu  
 145 150 155 160

15 Glu Asp Met Asp Val Lys Ile Ile Pro Val Glu Asp Ser Lys Lys Gln  
 165 170 175

20 Phe Asp Val Val Glu Lys Asp Asp Val Val Ile Leu Pro Ala Phe Gly  
 180 185 190

25 Ala Gly Val Asp Glu Met Tyr Val Leu Asn Asp Lys Lys Val Gln Ile  
 195 200 205

30 Val Asp Thr Thr Cys Pro Trp Val Thr Lys Val Trp Asn Thr Val Glu  
 210 215 220

35 Lys His Lys Lys Gly Glu Tyr Thr Ser Val Ile His Gly Lys Tyr Asn  
 225 230 235 240

40 His Glu Glu Thr Ile Ala Thr Ala Ser Phe Ala Gly Lys Tyr Ile Ile  
 245 250 255

45 Val Lys Asn Met Lys Glu Ala Asn Tyr Val Cys Asp Tyr Ile Leu Gly  
 260 265 270

50 Gly Gln Tyr Asp Gly Ser Ser Ser Thr Lys Glu Glu Phe Met Glu Lys  
 275 280 285

Phe Lys Tyr Ala Ile Ser Lys Gly Phe Asp Pro Asp Asn Asp Leu Val  
 290 295 300

Lys Val Gly Ile Ala Asn Gln Thr Thr Met Leu Lys Gly Glu Thr Glu  
 305 310 315 320

141

Glu Ile Gly Arg Leu Leu Glu Thr Thr Met Met Arg Lys Tyr Gly Val  
                           325                          330                          335

5 Glu Asn Val Ser Gly His Phe Ile Ser Phe Asn Thr Ile Cys Asp Ala  
                           340                          345                          350

10 Thr Gln Glu Arg Gln Asp Ala Ile Tyr Glu Leu Val Glu Glu Lys Ile  
                           355                          360                          365

15 Asp Leu Met Leu Val Val Gly Gly Trp Asn Ser Ser Asn Thr Ser His  
                           370                          375                          380

Leu Gln Glu Ile Ser Glu Ala Arg Gly Ile Pro Ser Tyr Trp Ile Asp  
                           385                          390                          395                          400

20 Ser Glu Lys Arg Ile Gly Pro Gly Asn Lys Ile Ala Tyr Lys Leu His  
                           405                          410                          415

25 Tyr Gly Glu Leu Val Glu Lys Glu Asn Phe Leu Pro Lys Gly Pro Ile  
                           420                          425                          430

30 Thr Ile Gly Val Thr Ser Gly Ala Ser Thr Pro Asp Lys Val Val Glu  
                           435                          440                          445

35 Asp Ala Leu Val Lys Val Phe Asp Ile Lys Arg Glu Glu Leu Leu Gln  
                           450                          455                          460

Leu Ala  
           465

40 <210> 103

<211> 2160

45 <212> DNA

<213> Lycopersicon esculentum

50

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

5 &lt;222&gt; (1)..(2160)

&lt;223&gt;

10

&lt;400&gt; 103

atg gct ttg tgt gct tat gca ttt cct ggg att ttg aac agg act ggt	48
Met Ala Leu Cys Ala Tyr Ala Phe Pro Gly Ile Leu Asn Arg Thr Gly	
1 5 10 15	

15

gtg gtt tca gat tct tct aag gca acc cct ttg ttc tct gga tgg att	96
Val Val Ser Asp Ser Ser Lys Ala Thr Pro Leu Phe Ser Gly Trp Ile	
20 25 30	

20

cat gga aca gat ctg cag ttt ttg ttc caa cac aag ctt act cat gag	144
His Gly Thr Asp Leu Gln Phe Leu Phe Gln His Lys Leu Thr His Glu	
35 40 45	

25

gtc aag aaa agg tca cgt gtg gtt cag gct tcc tta tca gaa tct gga	192
Val Lys Lys Arg Ser Arg Val Val Gln Ala Ser Leu Ser Glu Ser Gly	
50 55 60	

30

gaa tac tac aca cag aga ccg cca acg cct att ttg gac act gtg aac	240
Glu Tyr Tyr Thr Gln Arg Pro Pro Thr Pro Ile Leu Asp Thr Val Asn	
65 70 75 80	

35

tat ccc att cat atg aaa aat ctg tct ctg aag gaa ctt aaa caa cta	288
Tyr Pro Ile His Met Lys Asn Leu Ser Leu Lys Glu Leu Lys Gln Leu	
85 90 95	

gca gat gaa cta agg tca gat aca att ttc aat gta tca aag act ggg	336
Ala Asp Glu Leu Arg Ser Asp Thr Ile Phe Asn Val Ser Lys Thr Gly	
100 105 110	

40

ggg cac ctt ggc tca agt ctt ggt gtt gtt gag ctg act gtt gct ctt	384
Gly His Leu Gly Ser Ser Leu Gly Val Val Glu Leu Thr Val Ala Leu	
115 120 125	

45

cat tat gtc ttc aat gca ccg caa gat agg att ctc tgg gat gtt ggt	432
His Tyr Val Phe Asn Ala Pro Gln Asp Arg Ile Leu Trp Asp Val Gly	
130 135 140	

50

cat cag tct tat cct cac aaa atc ttg act ggt aga agg gac aag atg	480
His Gln Ser Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Asp Lys Met	
145 150 155 160	

5	tcg aca tta agg cag aca gat ggt ctt gca gga ttt act aag cga tcg	528
	Ser Thr Leu Arg Gln Thr Asp Gly Leu Ala Gly Phe Thr Lys Arg Ser	
	165 170 175	
10	gag agt gaa tat gat tgc ttt ggc acc ggc cac agt tcc acc acc atc	576
	Glu Ser Glu Tyr Asp Cys Phe Gly Thr Gly His Ser Ser Thr Thr Ile	
	180 185 190	
15	tca gca ggc cta ggg atg gct gtt ggt aga gat cta aaa gga aga aac	624
	Ser Ala Gly Leu Gly Met Ala Val Gly Arg Asp Leu Lys Gly Arg Asn	
	195 200 205	
20	aac aat gtt att gcc gta ata ggt gat ggt gcc atg aca gca ggt caa	672
	Asn Asn Val Ile Ala Val Ile Gly Asp Gly Ala Met Thr Ala Gly Gln	
	210 215 220	
25	gct tat gaa gcc atg aat aat gct ggt tac ctg gac tct gac atg att	720
	Ala Tyr Glu Ala Met Asn Asn Ala Gly Tyr Leu Asp Ser Asp Met Ile	
	225 230 235 240	
30	ggt atc tta aac gac aat aga caa gtt tct tta cct act gct act ctg	768
	Val Ile Leu Asn Asp Asn Arg Gln Val Ser Leu Pro Thr Ala Thr Leu	
	245 250 255	
35	gat ggg cca gtt gct cct gtt gga gct cta agt agt gct ttg agc agg	816
	Asp Gly Pro Val Ala Pro Val Gly Ala Leu Ser Ser Ala Leu Ser Arg	
	260 265 270	
40	tta cag tct aat agg cct ctc aga gaa cta aga gaa gtc gca aag gga	864
	Leu Gln Ser Asn Arg Pro Leu Arg Glu Leu Arg Glu Val Ala Lys Gly	
	275 280 285	
45	ggt act aag cag att ggt ggt cct atg cat gag ctt gct gca aaa gtt	912
	Val Thr Lys Gln Ile Gly Gly Pro Met His Glu Leu Ala Ala Lys Val	
	290 295 300	
50	gat gaa tat gct cgt ggc atg att agt ggt tct gga tca aca ttg ttt	960
	Asp Glu Tyr Ala Arg Gly Met Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Leu Phe	
	305 310 315 320	
55	gaa gaa ctt gga ctt tac tat att ggt cct gtg gat ggt cac aac att	1008
	Glu Glu Leu Gly Leu Tyr Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly His Asn Ile	
	325 330 335	
60	gat gat cta att gcg att ctc aaa gag gtt aga agt act aaa aca aca	1056
	Asp Asp Leu Ile Ala Ile Leu Lys Glu Val Arg Ser Thr Lys Thr Thr	
	340 345 350	
65	ggt cca gta ctg atc cat gtt gtc act gag aaa ggc aga ggt tat cca	1104



	Gly	Pro	Val	Leu	Ile	His	Val	Val	Thr	Glu	Lys	Gly	Arg	Gly	Tyr	Pro	
	355								360					365			
5	tat	gct	gag	aga	gct	gca	gat	aag	tat	cat	gga	gtt	gcc	aag	ttt	gat	1152
	Tyr	Ala	Glu	Arg	Ala	Ala	Asp	Lys	Tyr	His	Gly	Val	Ala	Lys	Phe	Asp	
	370						375				380						
10	cca	gca	aca	gga	aag	caa	ttc	aaa	gcc	agt	gcc	aag	aca	cag	tcc	tat	1200
	Pro	Ala	Thr	Gly	Lys	Gln	Phe	Lys	Ala	Ser	Ala	Lys	Thr	Gln	Ser	Tyr	
	385					390				395					400		
15	aca	aca	tat	ttt	gcc	gag	gct	tta	att	gca	gaa	gca	gaa	gca	gat	aaa	1248
	Thr	Thr	Tyr	Phe	Ala	Glu	Ala	Leu	Ile	Ala	Glu	Ala	Glu	Ala	Asp	Lys	
				405					410						415		
20	gac	att	gtt	gca	atc	cat	gct	gcc	atg	ggg	ggg	ggg	acc	gga	atg	aac	1296
	Asp	Ile	Val	Ala	Ile	His	Ala	Ala	Met	Gly	Gly	Gly	Thr	Gly	Met	Asn	
				420					425						430		
25	ctt	ttc	cat	cgt	cgc	ttc	cca	aca	agg	tgt	ttt	gat	gtt	gga	ata	gca	1344
	Leu	Phe	His	Arg	Arg	Phe	Pro	Thr	Arg	Cys	Phe	Asp	Val	Gly	Ile	Ala	
				435					440					445			
30	gaa	caa	cat	gca	gta	acc	ttt	gct	gct	gga	ttg	gct	tgt	gaa	ggc	att	1392
	Glu	Gln	His	Ala	Val	Thr	Phe	Ala	Ala	Gly	Leu	Ala	Cys	Glu	Gly	Ile	
				450					455					460			
35	aaa	cct	ttc	tgt	gca	atc	tat	tcg	tct	ttc	atg	cag	agg	gct	tat	gac	1440
	Lys	Pro	Phe	Cys	Ala	Ile	Tyr	Ser	Ser	Phe	Met	Gln	Arg	Ala	Tyr	Asp	
	465					470					475					480	
40	cag	gta	gtg	cat	gac	gtt	gat	ttg	caa	aag	ctg	ccc	gtg	agg	ttt	gca	1488
	Gln	Val	Val	His	Asp	Val	Asp	Leu	Gln	Lys	Leu	Pro	Val	Arg	Phe	Ala	
					485					490					495		
45	atg	gac	aga	gca	ggg	ctt	gtt	gga	gca	gat	ggg	cca	aca	cat	tgt	ggg	1536
	Met	Asp	Arg	Ala	Gly	Leu	Val	Gly	Ala	Asp	Gly	Pro	Thr	His	Cys	Gly	
				500					505						510		
50	gca	ttt	gat	gtt	act	tac	atg	gca	tgt	ctt	cct	aac	atg	gtt	gta	atg	1584
	Ala	Phe	Asp	Val	Thr	Tyr	Met	Ala	Cys	Leu	Pro	Asn	Met	Val	Val	Met	
				515					520					525			
55	gct	cct	tct	gat	gaa	gcg	gag	cta	ttt	cac	atg	gta	gca	act	gct	gcc	1632
	Ala	Pro	Ser	Asp	Glu	Ala	Glu	Leu	Phe	His	Met	Val	Ala	Thr	Ala	Ala	
				530					535					540			
60	gcc	att	gat	gac	aga	cca	agt	tgt	ttt	aga	tac	cca	aga	gga	aat	ggg	1680
	Ala	Ile	Asp	Asp	Arg	Pro	Ser	Cys	Phe	Arg	Tyr	Pro	Arg	Gly	Asn	Gly	
	545					550					555					560	

	atc ggt gta gag ctt ccg gct gga aac aaa gga att cct ctt gag gtt	1728
	Ile Gly Val Glu Leu Pro Ala Gly Asn Lys Gly Ile Pro Leu Glu Val	
	565 570 575	
5	ggt aaa ggt agg ata ttg att gag ggg gag aga gtg gct cta ttg gga	1776
	Gly Lys Gly Arg Ile Leu Ile Glu Gly Glu Arg Val Ala Leu Leu Gly	
	580 585 590	
10	tat ggc tca gca gtg cag aac tgt ttg gat gct gct att gtg cta gaa	1824
	Tyr Gly Ser Ala Val Gln Asn Cys Leu Asp Ala Ala Ile Val Leu Glu	
	595 600 605	
15	tcc cgc ggc tta caa gta aca gtt gca gat gca cgt ttc tgc aaa cca	1872
	Ser Arg Gly Leu Gln Val Thr Val Ala Asp Ala Arg Phe Cys Lys Pro	
	610 615 620	
20	ctg gac cat gcc ctc ata agg agc ctt gca aaa tca cat gaa gtg cta	1920
	Leu Asp His Ala Leu Ile Arg Ser Leu Ala Lys Ser His Glu Val Leu	
	625 630 635 640	
25	atc act gtc gaa gaa gga tca att gga ggt ttt gga tct cat gtt gtt	1968
	Ile Thr Val Glu Glu Gly Ser Ile Gly Gly Phe Gly Ser His Val Val	
	645 650 655	
30	cag ttc atg gcc tta gat ggg ctt ctt gat ggc aag ttg aag tgg aga	2016
	Gln Phe Met Ala Leu Asp Gly Leu Leu Asp Gly Lys Leu Lys Trp Arg	
	660 665 670	
35	cca ata gtt ctt cct gat cga tac att gac cat gga tct cct gtt gat	2064
	Pro Ile Val Leu Pro Asp Arg Tyr Ile Asp His Gly Ser Pro Val Asp	
	675 680 685	
40	cag ttg gcg gaa gct ggc cta aca cca tct cac att gca gca aca gta	2112
	Gln Leu Ala Glu Ala Gly Leu Thr Pro Ser His Ile Ala Ala Thr Val	
	690 695 700	
45	ttt aac ata ctt gga caa acc aga gag gct cta gag gtc atg aca taa	2160
	Phe Asn Ile Leu Gly Gln Thr Arg Glu Ala Leu Glu Val Met Thr	
	705 710 715	
	<210> 104	
50	<211> 719	
	<212> PRT	
	<213> Lycopersicon esculentum	

&lt;400&gt; 104

5 Met Ala Leu Cys Ala Tyr Ala Phe Pro Gly Ile Leu Asn Arg Thr Gly  
 1 5 10 15

10 Val Val Ser Asp Ser Ser Lys Ala Thr Pro Leu Phe Ser Gly Trp Ile  
 20 25 30

15 His Gly Thr Asp Leu Gln Phe Leu Phe Gln His Lys Leu Thr His Glu  
 35 40 45

Val Lys Lys Arg Ser Arg Val Val Gln Ala Ser Leu Ser Glu Ser Gly  
 50 55 60

20 Glu Tyr Tyr Thr Gln Arg Pro Pro Thr Pro Ile Leu Asp Thr Val Asn  
 65 70 75 80

25 Tyr Pro Ile His Met Lys Asn Leu Ser Leu Lys Glu Leu Lys Gln Leu  
 85 90 95

30 Ala Asp Glu Leu Arg Ser Asp Thr Ile Phe Asn Val Ser Lys Thr Gly  
 100 105 110

35 Gly His Leu Gly Ser Ser Leu Gly Val Val Glu Leu Thr Val Ala Leu  
 115 120 125

His Tyr Val Phe Asn Ala Pro Gln Asp Arg Ile Leu Trp Asp Val Gly  
 130 135 140

40 His Gln Ser Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Asp Lys Met  
 145 150 155 160

45 Ser Thr Leu Arg Gln Thr Asp Gly Leu Ala Gly Phe Thr Lys Arg Ser  
 165 170 175

50 Glu Ser Glu Tyr Asp Cys Phe Gly Thr Gly His Ser Ser Thr Thr Ile  
 180 185 190

5 Ser Ala Gly Leu Gly Met Ala Val Gly Arg Asp Leu Lys Gly Arg Asn  
195 200 205

10 Asn Asn Val Ile Ala Val Ile Gly Asp Gly Ala Met Thr Ala Gly Gln  
210 215 220

15 Ala Tyr Glu Ala Met Asn Asn Ala Gly Tyr Leu Asp Ser Asp Met Ile  
225 230 235 240

20 Val Ile Leu Asn Asp Asn Arg Gln Val Ser Leu Pro Thr Ala Thr Leu  
245 250 255

25 Asp Gly Pro Val Ala Pro Val Gly Ala Leu Ser Ser Ala Leu Ser Arg  
260 265 270

30 Leu Gln Ser Asn Arg Pro Leu Arg Glu Leu Arg Glu Val Ala Lys Gly  
275 280 285

35 Val Thr Lys Gln Ile Gly Gly Pro Met His Glu Leu Ala Ala Lys Val  
290 295 300

40 Asp Glu Tyr Ala Arg Gly Met Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Leu Phe  
305 310 315 320

45 Glu Glu Leu Gly Leu Tyr Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly His Asn Ile  
325 330 335

50 Asp Asp Leu Ile Ala Ile Leu Lys Glu Val Arg Ser Thr Lys Thr Thr  
340 345 350

Gly Pro Val Leu Ile His Val Val Thr Glu Lys Gly Arg Gly Tyr Pro  
355 360 365

Tyr Ala Glu Arg Ala Ala Asp Lys Tyr His Gly Val Ala Lys Phe Asp  
370 375 380

## 148

	Pro	Ala	Thr	Gly	Lys	Gln	Phe	Lys	Ala	Ser	Ala	Lys	Thr	Gln	Ser	Tyr	
	385					390					395					400	
5	Thr	Thr	Tyr	Phe	Ala	Glu	Ala	Leu	Ile	Ala	Glu	Ala	Glu	Ala	Asp	Lys	
					405					410					415		
10	Asp	Ile	Val	Ala	Ile	His	Ala	Ala	Met	Gly	Gly	Gly	Thr	Gly	Met	Asn	
				420					425						430		
15	Leu	Phe	His	Arg	Arg	Phe	Pro	Thr	Arg	Cys	Phe	Asp	Val	Gly	Ile	Ala	
			435					440						445			
20	Glu	Gln	His	Ala	Val	Thr	Phe	Ala	Ala	Gly	Leu	Ala	Cys	Glu	Gly	Ile	
		450					455					460					
25	Lys	Pro	Phe	Cys	Ala	Ile	Tyr	Ser	Ser	Phe	Met	Gln	Arg	Ala	Tyr	Asp	
	465					470					475					480	
30	Gln	Val	Val	His	Asp	Val	Asp	Leu	Gln	Lys	Leu	Pro	Val	Arg	Phe	Ala	
					485					490					495		
35	Met	Asp	Arg	Ala	Gly	Leu	Val	Gly	Ala	Asp	Gly	Pro	Thr	His	Cys	Gly	
			500						505					510			
40	Ala	Phe	Asp	Val	Thr	Tyr	Met	Ala	Cys	Leu	Pro	Asn	Met	Val	Val	Met	
			515					520					525				
45	Ala	Pro	Ser	Asp	Glu	Ala	Glu	Leu	Phe	His	Met	Val	Ala	Thr	Ala	Ala	
		530					535					540					
50	Ala	Ile	Asp	Asp	Arg	Pro	Ser	Cys	Phe	Arg	Tyr	Pro	Arg	Gly	Asn	Gly	
	545					550				555					560		
55	Ile	Gly	Val	Glu	Leu	Pro	Ala	Gly	Asn	Lys	Gly	Ile	Pro	Leu	Glu	Val	
				565					570					575			
60	Gly	Lys	Gly	Arg	Ile	Leu	Ile	Glu	Gly	Glu	Arg	Val	Ala	Leu	Leu	Gly	
				580				585						590			

5 Tyr Gly Ser Ala Val Gln Asn Cys Leu Asp Ala Ala Ile Val Leu Glu  
595 600 605

10 Ser Arg Gly Leu Gln Val Thr Val Ala Asp Ala Arg Phe Cys Lys Pro  
610 615 620

15 Leu Asp His Ala Leu Ile Arg Ser Leu Ala Lys Ser His Glu Val Leu  
625 630 635 640

20 Ile Thr Val Glu Glu Gly Ser Ile Gly Gly Phe Gly Ser His Val Val  
645 650 655

25 Gln Phe Met Ala Leu Asp Gly Leu Leu Asp Gly Lys Leu Lys Trp Arg  
660 665 670

30 Pro Ile Val Leu Pro Asp Arg Tyr Ile Asp His Gly Ser Pro Val Asp  
675 680 685

35 Gln Leu Ala Glu Ala Gly Leu Thr Pro Ser His Ile Ala Ala Thr Val  
690 695 700

40 Phe Asn Ile Leu Gly Gln Thr Arg Glu Ala Leu Glu Val Met Thr  
705 710 715

45 <210> 105

<211> 1434

<212> DNA

40 <213> Arabidopsis thaliana

45 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(1434)

50

&lt;223&gt;

5 <400> 105  
 atg atg aca tta aac tca cta tct cca gct gaa tcc aaa gct att tct 48  
 Met Met Thr Leu Asn Ser Leu Ser Pro Ala Glu Ser Lys Ala Ile Ser  
 1 5 10 15

10 ttc ttg gat acc tcc agg ttc aat cca atc cct aaa ctc tca ggt ggg 96  
 Phe Leu Asp Thr Ser Arg Phe Asn Pro Ile Pro Lys Leu Ser Gly Gly  
 20 25 30

15 ttt agt ttg agg agg agg aat caa ggg aga ggt ttt gga aaa ggt gtt 144  
 Phe Ser Leu Arg Arg Arg Asn Gln Gly Arg Gly Phe Gly Lys Gly Val  
 35 40 45

20 aag tgt tca gtg aaa gtg cag cag caa caa caa cct cct cca gca tgg 192  
 Lys Cys Ser Val Lys Val Gln Gln Gln Gln Gln Pro Pro Pro Ala Trp  
 50 55 60

25 cct ggg aga gct gtc cct gag gcg cct cgt caa tct tgg gat gga cca 240  
 Pro Gly Arg Ala Val Pro Glu Ala Pro Arg Gln Ser Trp Asp Gly Pro  
 65 70 75 80

aaa ccc atc tct atc gtt gga tct act ggt tct att ggc act cag aca 288  
 Lys Pro Ile Ser Ile Val Gly Ser Thr Gly Ser Ile Gly Thr Gln Thr  
 85 90 95

30 ttg gat att gtg gct gag aat cct gac aaa ttc aga gtt gtg gct cta 336  
 Leu Asp Ile Val Ala Glu Asn Pro Asp Lys Phe Arg Val Val Ala Leu  
 100 105 110

35 gct gct ggt tcg aat gtt act cta ctt gct gat cag gta agg aga ttt 384  
 Ala Ala Gly Ser Asn Val Thr Leu Leu Ala Asp Gln Val Arg Arg Phe  
 115 120 125

40 aag cct gca ttg gtt gct gtt aga aac gag tca ctg att aat gag ctt 432  
 Lys Pro Ala Leu Val Ala Val Arg Asn Glu Ser Leu Ile Asn Glu Leu  
 130 135 140

45 aaa gag gct tta gct gat ttg gac tat aaa ctc gag att att cca gga 480  
 Lys Glu Ala Leu Ala Asp Leu Asp Tyr Lys Leu Glu Ile Ile Pro Gly  
 145 150 155 160

gag caa gga gtg att gag gtt gcc cga cat cct gaa gct gta acc gtt 528  
 Glu Gln Gly Val Ile Glu Val Ala Arg His Pro Glu Ala Val Thr Val  
 165 170 175

50 gtt acc gga ata gta ggt tgt gcg gga cta aag cct acg gtt gct gca 576

	Val	Thr	Gly	Ile	Val	Gly	Cys	Ala	Gly	Leu	Lys	Pro	Thr	Val	Ala	Ala	
				180					185					190			
5	att	gaa	gca	gga	aag	gac	att	gct	ctt	gca	aac	aaa	gag	aca	tta	atc	624
	Ile	Glu	Ala	Gly	Lys	Asp	Ile	Ala	Leu	Ala	Asn	Lys	Glu	Thr	Leu	Ile	
			195					200					205				
10	gca	ggt	ggt	cct	ttc	gtg	ctt	ccg	ctt	gcc	aac	aaa	cat	aat	gta	aag	672
	Ala	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Leu	Pro	Leu	Ala	Asn	Lys	His	Asn	Val	Lys	
		210					215				220						
15	att	ctt	ccg	gca	gat	tca	gaa	cat	tct	gcc	ata	ttt	cag	tgt	att	caa	720
	Ile	Leu	Pro	Ala	Asp	Ser	Glu	His	Ser	Ala	Ile	Phe	Gln	Cys	Ile	Gln	
	225				230				235				240				
	ggt	ttg	cct	gaa	ggc	gct	ctg	cgc	aag	ata	atc	ttg	act	gca	tct	ggt	768
	Gly	Leu	Pro	Glu	Gly	Ala	Leu	Arg	Lys	Ile	Ile	Leu	Thr	Ala	Ser	Gly	
				245				250					255				
20	gga	gct	ttt	agg	gat	tgg	cct	gtc	gaa	aag	cta	aag	gaa	gtt	aaa	gta	816
	Gly	Ala	Phe	Arg	Asp	Trp	Pro	Val	Glu	Lys	Leu	Lys	Glu	Val	Lys	Val	
			260					265					270				
25	gcg	gat	gcg	ttg	aag	cat	cca	aac	tgg	aac	atg	gga	aag	aaa	atc	act	864
	Ala	Asp	Ala	Leu	Lys	His	Pro	Asn	Trp	Asn	Met	Gly	Lys	Lys	Ile	Thr	
		275						280				285					
30	gtg	gac	tct	gct	acg	ctt	ttc	aac	aag	ggt	ctt	gag	gtc	att	gaa	gcg	912
	Val	Asp	Ser	Ala	Thr	Leu	Phe	Asn	Lys	Gly	Leu	Glu	Val	Ile	Glu	Ala	
	290					295						300					
35	cat	tat	ttg	ttt	gga	gct	gag	tat	gac	gat	ata	gag	att	gtc	att	cat	960
	His	Tyr	Leu	Phe	Gly	Ala	Glu	Tyr	Asp	Asp	Ile	Glu	Ile	Val	Ile	His	
	305				310				315			320					
	ccg	caa	agt	atc	ata	cat	tcc	atg	att	gaa	aca	cag	gat	tca	tct	gtg	1008
	Pro	Gln	Ser	Ile	Ile	His	Ser	Met	Ile	Glu	Thr	Gln	Asp	Ser	Ser	Val	
				325				330				335					
40	ctt	gct	caa	ttg	ggt	tgg	cct	gat	atg	cgt	tta	ccg	att	ctc	tac	acc	1056
	Leu	Ala	Gln	Leu	Gly	Trp	Pro	Asp	Met	Arg	Leu	Pro	Ile	Leu	Tyr	Thr	
			340					345				350					
45	atg	tca	tgg	ccc	gat	aga	gtt	cct	tgt	tct	gaa	gta	act	tgg	cca	aga	1104
	Met	Ser	Trp	Pro	Asp	Arg	Val	Pro	Cys	Ser	Glu	Val	Thr	Trp	Pro	Arg	
		355						360				365					
50	ctt	gac	ctt	tgc	aaa	ctc	ggt	tca	ttg	act	ttc	aag	aaa	cca	gac	aat	1152
	Leu	Asp	Leu	Cys	Lys	Leu	Gly	Ser	Leu	Thr	Phe	Lys	Lys	Pro	Asp	Asn	
		370					375				380						



gtg aaa tac cca tcc atg gat ctt gct tat gct gct gga cga gct gga 1200  
 Val Lys Tyr Pro Ser Met Asp Leu Ala Tyr Ala Ala Gly Arg Ala Gly  
 385 390 395 400  
 5  
 ggc aca atg act gga gtt ctc agc gcc gcc aat gag aaa gct gtt gaa 1248  
 Gly Thr Met Thr Gly Val Leu Ser Ala Ala Asn Glu Lys Ala Val Glu  
 405 410 415  
 10 atg ttc att gat gaa aag ata agc tat ttg gat atc ttc aag gtt gtg 1296  
 Met Phe Ile Asp Glu Lys Ile Ser Tyr Leu Asp Ile Phe Lys Val Val  
 420 425 430  
 15 gaa tta aca tgc gat aaa cat cga aac gag ttg gta aca tca ccg tct 1344  
 Glu Leu Thr Cys Asp Lys His Arg Asn Glu Leu Val Thr Ser Pro Ser  
 435 440 445  
 20 ctt gaa gag att gtt cac tat gac ttg tgg gca cgt gaa tat gcc gcg 1392  
 Leu Glu Glu Ile Val His Tyr Asp Leu Trp Ala Arg Glu Tyr Ala Ala  
 450 455 460  
 aat gtg cag ctt tct tct ggt gct agg cca gtt cat gca tga 1434  
 Asn Val Gln Leu Ser Ser Gly Ala Arg Pro Val His Ala  
 465 470 475  
 25  
 <210> 106  
 <211> 477  
 30  
 <212> PRT  
 <213> Arabidopsis thaliana  
 35  
 <400> 106  
 40 Met Met Thr Leu Asn Ser Leu Ser Pro Ala Glu Ser Lys Ala Ile Ser  
 1 5 10 15  
 Phe Leu Asp Thr Ser Arg Phe Asn Pro Ile Pro Lys Leu Ser Gly Gly  
 20 25 30  
 45  
 Phe Ser Leu Arg Arg Arg Asn Gln Gly Arg Gly Phe Gly Lys Gly Val  
 35 40 45  
 50

	Lys	Cys	Ser	Val	Lys	Val	Gln	Gln	Gln	Gln	Pro	Pro	Pro	Ala	Trp	
	50						55				60					
5	Pro	Gly	Arg	Ala	Val	Pro	Glu	Ala	Pro	Arg	Gln	Ser	Trp	Asp	Gly	Pro
	65					70					75					80
10	Lys	Pro	Ile	Ser	Ile	Val	Gly	Ser	Thr	Gly	Ser	Ile	Gly	Thr	Gln	Thr
					85					90					95	
15	Leu	Asp	Ile	Val	Ala	Glu	Asn	Pro	Asp	Lys	Phe	Arg	Val	Val	Ala	Leu
				100					105						110	
20	Ala	Ala	Gly	Ser	Asn	Val	Thr	Leu	Leu	Ala	Asp	Gln	Val	Arg	Arg	Phe
			115					120					125			
25	Lys	Pro	Ala	Leu	Val	Ala	Val	Arg	Asn	Glu	Ser	Leu	Ile	Asn	Glu	Leu
	130						135					140				
30	Lys	Glu	Ala	Leu	Ala	Asp	Leu	Asp	Tyr	Lys	Leu	Glu	Ile	Ile	Pro	Gly
	145					150					155					160
35	Glu	Gln	Gly	Val	Ile	Glu	Val	Ala	Arg	His	Pro	Glu	Ala	Val	Thr	Val
				165						170					175	
40	Val	Thr	Gly	Ile	Val	Gly	Cys	Ala	Gly	Leu	Lys	Pro	Thr	Val	Ala	Ala
			180						185					190		
45	Ile	Glu	Ala	Gly	Lys	Asp	Ile	Ala	Leu	Ala	Asn	Lys	Glu	Thr	Leu	Ile
		195						200					205			
50	Ala	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Leu	Pro	Leu	Ala	Asn	Lys	His	Asn	Val	Lys
	210						215					220				
55	Ile	Leu	Pro	Ala	Asp	Ser	Glu	His	Ser	Ala	Ile	Phe	Gln	Cys	Ile	Gln
	225					230					235					240
60	Gly	Leu	Pro	Glu	Gly	Ala	Leu	Arg	Lys	Ile	Ile	Leu	Thr	Ala	Ser	Gly
					245					250					255	

5 Gly Ala Phe Arg Asp Trp Pro Val Glu Lys Leu Lys Glu Val Lys Val  
260 265 270

10 Ala Asp Ala Leu Lys His Pro Asn Trp Asn Met Gly Lys Lys Ile Thr  
275 280 285

15 Val Asp Ser Ala Thr Leu Phe Asn Lys Gly Leu Glu Val Ile Glu Ala  
290 295 300

20 His Tyr Leu Phe Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Ile Glu Ile Val Ile His  
305 310 315 320

25 Pro Gln Ser Ile Ile His Ser Met Ile Glu Thr Gln Asp Ser Ser Val  
325 330 335

30 Leu Ala Gln Leu Gly Trp Pro Asp Met Arg Leu Pro Ile Leu Tyr Thr  
340 345 350

35 Met Ser Trp Pro Asp Arg Val Pro Cys Ser Glu Val Thr Trp Pro Arg  
355 360 365

40 Leu Asp Leu Cys Lys Leu Gly Ser Leu Thr Phe Lys Lys Pro Asp Asn  
370 375 380

45 Val Lys Tyr Pro Ser Met Asp Leu Ala Tyr Ala Ala Gly Arg Ala Gly  
385 390 395 400

50 Gly Thr Met Thr Gly Val Leu Ser Ala Ala Asn Glu Lys Ala Val Glu  
405 410 415

Met Phe Ile Asp Glu Lys Ile Ser Tyr Leu Asp Ile Phe Lys Val Val  
420 425 430

Glu Leu Thr Cys Asp Lys His Arg Asn Glu Leu Val Thr Ser Pro Ser  
435 440 445

Leu Glu Glu Ile Val His Tyr Asp Leu Trp Ala Arg Glu Tyr Ala Ala  
 450 455 460

5 Asn Val Gln Leu Ser Ser Gly Ala Arg Pro Val His Ala  
 465 470 475

<210> 107

10

<211> 884

<212> DNA

15 <213> Adonis palaestina clone ApIPI28

<220>

20

<221> CDS

<222> (180)..(884)

25 <223>

<400> 107

30 cgtcgatcag gattaatcct ttatatagta tcttctccac caccactaaa acattatcag 60

cttcgtgttc ttctcccgcgt gttcatcttc agcagcggtg tegtactctt tctatttctt 120

35 cttccatcac taacagtcct cgccgagggt tgaatcggct gttcgctca acgtcgact 179

atg ggt gaa gtc gct gat gct ggt atg gat gcc gtc cag aag cgg ctt 227  
 Met Gly Glu Val Ala Asp Ala Gly Met Asp Ala Val Gln Lys Arg Leu  
 1 5 10 15

40 atg ttc gac gat gaa tgt att ttg gtg gat gag aat gac aag gtc gtc 275  
 Met Phe Asp Asp Glu Cys Ile Leu Val Asp Glu Asn Asp Lys Val Val  
 20 25 30

45 gga cat gat tcc aaa tac aac tgt cat ttg atg gaa aag ata gag gca 323  
 Gly His Asp Ser Lys Tyr Asn Cys His Leu Met Glu Lys Ile Glu Ala  
 35 40 45

50 gaa aac ttg ctt cac aga gcc ttc agt gtt ttc tta ttc aac tca aaa 371  
 Glu Asn Leu Leu His Arg Ala Phe Ser Val Phe Leu Phe Asn Ser Lys  
 50 55 60

	tac gag ttg ctt ctt cag caa cga tct gca acg aag gta aca ttc ccg	419
	Tyr Glu Leu Leu Leu Gln Gln Arg Ser Ala Thr Lys Val Thr Phe Pro	
	65 70 75 80	
5	ctc gta tgg aca aac acc tgt tgc agc cat ccc ctc ttc cgt gat tcc	467
	Leu Val Trp Thr Asn Thr Cys Cys Ser His Pro Leu Phe Arg Asp Ser	
	85 90 95	
10	gaa ctc ata gaa gaa aat ttt ctc ggg gta cga aac gct gca caa agg	515
	Glu Leu Ile Glu Glu Asn Phe Leu Gly Val Arg Asn Ala Ala Gln Arg	
	100 105 110	
15	aag ctt tta gac gag cta ggc att cca gct gaa gac gta cca gtt gat	563
	Lys Leu Leu Asp Glu Leu Gly Ile Pro Ala Glu Asp Val Pro Val Asp	
	115 120 125	
20	gaa ttc act cct ctt ggt cgc att ctt tac aaa gct cca tct gac gga	611
	Glu Phe Thr Pro Leu Gly Arg Ile Leu Tyr Lys Ala Pro Ser Asp Gly	
	130 135 140	
25	aaa tgg gga gag cac gaa ctg gac tat ctt ctg ttt att gtc cga gat	659
	Lys Trp Gly Glu His Glu Leu Asp Tyr Leu Leu Phe Ile Val Arg Asp	
	145 150 155 160	
30	gtg aaa tac gat cca aac cca gat gaa gtt gct gac gct aag tac gtt	707
	Val Lys Tyr Asp Pro Asn Pro Asp Glu Val Ala Asp Ala Lys Tyr Val	
	165 170 175	
35	aat cgc gag gag ttg aaa gag ata ctg aga aaa gct gat gca ggt gaa	755
	Asn Arg Glu Glu Leu Lys Glu Ile Leu Arg Lys Ala Asp Ala Gly Glu	
	180 185 190	
40	gag gga ata aag ttg tct cct tgg ttt aga ttg gtt gtg gat aac ttt	803
	Glu Gly Ile Lys Leu Ser Pro Trp Phe Arg Leu Val Val Asp Asn Phe	
	195 200 205	
45	ttg ttc aag tgg tgg gat cat gta gag gag ggg aag att aag gac gtc	851
	Leu Phe Lys Trp Trp Asp His Val Glu Glu Gly Lys Ile Lys Asp Val	
	210 215 220	
50	gcc gac atg aaa act atc cac aag ttg act taa	884
	Ala Asp Met Lys Thr Ile His Lys Leu Thr	
	225 230	
	<210> 108	
	<211> 234	

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Adonis palaestina clone ApIPI28

5

&lt;400&gt; 108

10 Met Gly Glu Val Ala Asp Ala Gly Met Asp Ala Val Gln Lys Arg Leu  
1 5 10 15

15 Met Phe Asp Asp Glu Cys Ile Leu Val Asp Glu Asn Asp Lys Val Val  
20 25 30

20 Gly His Asp Ser Lys Tyr Asn Cys His Leu Met Glu Lys Ile Glu Ala  
35 40 45

Glu Asn Leu Leu His Arg Ala Phe Ser Val Phe Leu Phe Asn Ser Lys  
50 55 60

25 Tyr Glu Leu Leu Leu Gln Gln Arg Ser Ala Thr Lys Val Thr Phe Pro  
65 70 75 80

30 Leu Val Trp Thr Asn Thr Cys Cys Ser His Pro Leu Phe Arg Asp Ser  
85 90 95

35 Glu Leu Ile Glu Glu Asn Phe Leu Gly Val Arg Asn Ala Ala Gln Arg  
100 105 110

Lys Leu Leu Asp Glu Leu Gly Ile Pro Ala Glu Asp Val Pro Val Asp  
115 120 125

40 Glu Phe Thr Pro Leu Gly Arg Ile Leu Tyr Lys Ala Pro Ser Asp Gly  
130 135 140

45 Lys Trp Gly Glu His Glu Leu Asp Tyr Leu Leu Phe Ile Val Arg Asp  
145 150 155 160

50 Val Lys Tyr Asp Pro Asn Pro Asp Glu Val Ala Asp Ala Lys Tyr Val  
165 170 175

5

10

15

20

<211> 1402

<212> DNA

25

<213> Arabidopsis thaliana

**<220>**

30

<221> CDS

<222> (52) . . (1317)

35

<223>

<400> 109

40

aagtcctttgc ctctttgggtt tacttttcttc tgtttttogat ccatttagaa a atg tta 57  
Met Leu  
1

ttc acg agg agt gtt gct cgg att tct tct aag ttt ctg aga aac cgt 105  
Phe Thr Arg Ser Val Ala Arg Ile Ser Ser Lys Phe Leu Arg Asn Arg  
5 10 15

agc ttc tat ggc tcc tct caa tct ctc gcc tct cat cgg ttc gca atc 153  
 Ser Phe Tyr Gly Ser Ser Gln Ser Leu Ala Ser His Arg Phe Ala Ile  
 20 25 30

5	att ccc gat cag ggt cac tct tgt tct gac tct cca cac aag ggt tac	201
	Ile Pro Asp Gln Gly His Ser Cys Ser Asp Ser Pro His Lys Gly Tyr	
	35 40 45 50	
	ggt tgc aga aca act tat tca ttg aaa tct ccg gtt ttt ggt gga ttt	249
	Val Cys Arg Thr Thr Tyr Ser Leu Lys Ser Pro Val Phe Gly Gly Phe	
10	55 60 65	
	agt cat caa ctc tat cac cag agt agc tcc ttg gtt gag gag gag ctt	297
	Ser His Gln Leu Tyr His Gln Ser Ser Ser Leu Val Glu Glu Glu Leu	
	70 75 80	
	gac cca ttt tgc ctt gtt gcc gat gag ctg tca ctt ctt agt aat aag	345
15	Asp Pro Phe Ser Leu Val Ala Asp Glu Leu Ser Leu Leu Ser Asn Lys	
	85 90 95	
	ttg aga gag atg gta ctt gcc gag gtt cca aag ctt gcc tct gct gct	393
	Leu Arg Glu Met Val Leu Ala Glu Val Pro Lys Leu Ala Ser Ala Ala	
	100 105 110	
20	gag tac ttc ttc aaa agg ggt gtg caa gga aaa cag ttt cgt tca act	441
	Glu Tyr Phe Phe Lys Arg Gly Val Gln Gly Lys Gln Phe Arg Ser Thr	
	115 120 125 130	
	att ttg ctg ctg atg gcg aca gct ctg gat gta cga gtt cca gaa gca	489
	Ile Leu Leu Leu Met Ala Thr Ala Leu Asp Val Arg Val Pro Glu Ala	
25	135 140 145	
	ttg att ggg gaa tca aca gat ata gtc aca tca gaa tta cgc gta agg	537
	Leu Ile Gly Glu Ser Thr Asp Ile Val Thr Ser Glu Leu Arg Val Arg	
	150 155 160	
	caa cgg ggt att gct gaa atc act gaa atg ata cac gtc gca agt cta	585
30	Gln Arg Gly Ile Ala Glu Ile Thr Glu Met Ile His Val Ala Ser Leu	
	165 170 175	
	ctg cac gat gat gtc ttg gat gat gcc gat aca agg cgt ggt gtt ggt	633
	Leu His Asp Asp Val Leu Asp Asp Ala Asp Thr Arg Arg Gly Val Gly	
	180 185 190	
35	tcc tta aat gtt gta atg ggt aac aag atg tgc gta tta gca gga gac	681
	Ser Leu Asn Val Val Met Gly Asn Lys Met Ser Val Leu Ala Gly Asp	
	195 200 205 210	
	ttc ttg ctc tcc cgg gct tgt ggg gct ctc gct gct tta aag aac aca	729
	Phe Leu Leu Ser Arg Ala Cys Gly Ala Leu Ala Ala Leu Lys Asn Thr	
40	215 220 225	
	gag gtt gta gca tta ctt gca act gct gta gaa cat ctt gtt acc ggt	777



160

	Glu	Val	Val	Ala	Leu	Leu	Ala	Thr	Ala	Val	Glu	His	Leu	Val	Thr	Gly		
	230								235				240					
5	gaa	acc	atg	gag	ata	act	agt	tca	acc	gag	cag	cgt	tat	agt	atg	gac	825	
	Glu	Thr	Met	Glu	Ile	Thr	Ser	Ser	Thr	Glu	Gln	Arg	Tyr	Ser	Met	Asp		
	245				250				255									
10	tac	tac	atg	cag	aag	aca	tat	tat	aag	aca	gca	tcg	cta	atc	tct	aac	873	
	Tyr	Tyr	Met	Gln	Lys	Thr	Tyr	Tyr	Lys	Thr	Ala	Ser	Leu	Ile	Ser	Asn		
	260				265				270									
15	agc	tgc	aaa	gct	gtt	gcc	gtt	ctc	act	gga	caa	aca	gca	gaa	gtt	gcc	921	
	Ser	Cys	Lys	Ala	Val	Ala	Val	Leu	Thr	Gly	Gln	Thr	Ala	Glu	Val	Ala		
	275				280				285				290					
	gtg	tta	gct	ttt	gag	tat	ggg	agg	aat	ctg	ggg	tta	gca	ttc	caa	tta	969	
	Val	Leu	Ala	Phe	Glu	Tyr	Gly	Arg	Asn	Leu	Gly	Leu	Ala	Phe	Gln	Leu		
	295				300				305									
20	ata	gac	gac	att	ctt	gat	ttc	acg	ggc	aca	tct	gcc	tct	ctc	gga	aag	1017	
	Ile	Asp	Asp	Ile	Leu	Asp	Phe	Thr	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly	Lys		
	310				315				320									
25	gga	tcg	ttg	tca	gat	att	cgc	cat	gga	gtc	ata	aca	gcc	cca	atc	ctc	1065	
	Gly	Ser	Leu	Ser	Asp	Ile	Arg	His	Gly	Val	Ile	Thr	Ala	Pro	Ile	Leu		
	325				330				335									
30	ttt	gcc	atg	gaa	gag	ttt	cct	caa	cta	cgc	gaa	gtt	gtt	gat	caa	gtt	1113	
	Phe	Ala	Met	Glu	Glu	Phe	Pro	Gln	Leu	Arg	Glu	Val	Val	Asp	Gln	Val		
	340				345				350									
35	gaa	aaa	gat	cct	agg	aat	gtt	gac	att	gct	tta	gag	tat	ctt	ggg	aag	1161	
	Glu	Lys	Asp	Pro	Arg	Asn	Val	Asp	Ile	Ala	Leu	Glu	Tyr	Leu	Gly	Lys		
	355				360				365				370					
	agc	aag	gga	ata	cag	agg	gca	aga	gaa	tta	gcc	atg	gaa	cat	gcg	aat	1209	
	Ser	Lys	Gly	Ile	Gln	Arg	Ala	Arg	Glu	Leu	Ala	Met	Glu	His	Ala	Asn		
	375				380				385									
40	cta	gca	gca	gct	gca	atc	ggg	tct	cta	cct	gaa	aca	gac	aat	gaa	gat	1257	
	Leu	Ala	Ala	Ala	Ala	Ile	Gly	Ser	Leu	Pro	Glu	Thr	Asp	Asn	Glu	Asp		
	390				395				400									
45	gtc	aaa	aga	tcg	agg	cgg	gca	ctt	att	gac	ttg	acc	cat	aga	gtc	atc	1305	
	Val	Lys	Arg	Ser	Arg	Arg	Ala	Leu	Ile	Asp	Leu	Thr	His	Arg	Val	Ile		
	405				410				415									
50	acc	aga	aac	aag	tgagattaag	taatgtttct	ctctatacac	caaaacattc									1357	
	Thr	Arg	Asn	Lys														
	420																	

ctcatttcat ttgtaggatt ttgttggtcc aattcgtttc acgaa

1402

5 &lt;210&gt; 110

&lt;211&gt; 422

&lt;212&gt; PRT

10

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

15 &lt;400&gt; 110

Met	Leu	Phe	Thr	Arg	Ser	Val	Ala	Arg	Ile	Ser	Ser	Lys	Phe	Leu	Arg
1				5					10					15	

20

Asn	Arg	Ser	Phe	Tyr	Gly	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Ala	Ser	His	Arg	Phe
			20					25					30		

25

Ala	Ile	Ile	Pro	Asp	Gln	Gly	His	Ser	Cys	Ser	Asp	Ser	Pro	His	Lys
		35					40					45			

30

Gly	Tyr	Val	Cys	Arg	Thr	Thr	Tyr	Ser	Leu	Lys	Ser	Pro	Val	Phe	Gly
	50					55					60				

35

Gly	Phe	Ser	His	Gln	Leu	Tyr	His	Gln	Ser	Ser	Ser	Leu	Val	Glu	Glu
65					70					75				80	

Glu	Leu	Asp	Pro	Phe	Ser	Leu	Val	Ala	Asp	Glu	Leu	Ser	Leu	Leu	Ser
				85					90					95	

40

Asn	Lys	Leu	Arg	Glu	Met	Val	Leu	Ala	Glu	Val	Pro	Lys	Leu	Ala	Ser
			100					105					110		

45

Ala	Ala	Glu	Tyr	Phe	Phe	Lys	Arg	Gly	Val	Gln	Gly	Lys	Gln	Phe	Arg
		115					120					125			

50

Ser	Thr	Ile	Leu	Leu	Leu	Met	Ala	Thr	Ala	Leu	Asp	Val	Arg	Val	Pro
	130					135					140				

5      Glu Ala Leu Ile Gly Glu Ser Thr Asp Ile Val Thr Ser Glu Leu Arg  
       145                                150                                155                                160

10     Val Arg Gln Arg Gly Ile Ala Glu Ile Thr Glu Met Ile His Val Ala  
    165                                170                                175

15     Ser Leu Leu His Asp Asp Val Leu Asp Asp Ala Asp Thr Arg Arg Gly  
    180                                185                                190

20     Val Gly Ser Leu Asn Val Val Met Gly Asn Lys Met Ser Val Leu Ala  
    195                                200                                205

25     Gly Asp Phe Leu Leu Ser Arg Ala Cys Gly Ala Leu Ala Ala Leu Lys  
    210                                215                                220

30     Asn Thr Glu Val Val Ala Leu Leu Ala Thr Ala Val Glu His Leu Val  
    225                                230                                235                                240

35     Thr Gly Glu Thr Met Glu Ile Thr Ser Ser Thr Glu Gln Arg Tyr Ser  
    245                                250                                255

40     Met Asp Tyr Tyr Met Gln Lys Thr Tyr Tyr Lys Thr Ala Ser Leu Ile  
    260                                265                                270

45     Ser Asn Ser Cys Lys Ala Val Ala Val Leu Thr Gly Gln Thr Ala Glu  
    275                                280                                285

50     Val Ala Val Leu Ala Phe Glu Tyr Gly Arg Asn Leu Gly Leu Ala Phe  
    290                                295                                300

55     Gln Leu Ile Asp Asp Ile Leu Asp Phe Thr Gly Thr Ser Ala Ser Leu  
    305                                310                                315                                320

60     Gly Lys Gly Ser Leu Ser Asp Ile Arg His Gly Val Ile Thr Ala Pro  
    325                                330                                335

## 163

Ile Leu Phe Ala Met Glu Glu Phe Pro Gln Leu Arg Glu Val Val Asp  
 340 345 350

5 Gln Val Glu Lys Asp Pro Arg Asn Val Asp Ile Ala Leu Glu Tyr Leu  
 355 360 365

10 Gly Lys Ser Lys Gly Ile Gln Arg Ala Arg Glu Leu Ala Met Glu His  
 370 375 380

15 Ala Asn Leu Ala Ala Ala Ala Ile Gly Ser Leu Pro Glu Thr Asp Asn  
 385 390 395 400

Glu Asp Val Lys Arg Ser Arg Arg Ala Leu Ile Asp Leu Thr His Arg  
 405 410 415

20 Val Ile Thr Arg Asn Lys  
 420

25 <210> 111

<211> 1155

<212> DNA

30 <213> Arabidopsis thaliana

35 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(1155)

40 <223>

45 <400> 111

atg agt gtg agt tgt tgt tgt agg aat ctg ggc aag aca ata aaa aag  
 Met Ser Val Ser Cys Cys Cys Arg Asn Leu Gly Lys Thr Ile Lys Lys  
 1 5 10 15

48

50 gca ata cct tca cat cat ttg cat ctg aga agt ctt ggt ggg agt ctc

96

Ala Ile Pro Ser His His Leu His Leu Arg Ser Leu Gly Gly Ser Leu  
20 25 30

	tat cgt cgt cgt atc caa agc tct tca atg gag acc gat ctc aag tca	144
5	Tyr Arg Arg Arg Ile Gln Ser Ser Ser Met Glu Thr Asp Leu Lys Ser	
	35 40 45	
	acc ttt ctc aac gtt tat tct gtt ctc aag tct gac ctt ctt cat gac	192
10	Thr Phe Leu Asn Val Tyr Ser Val Leu Lys Ser Asp Leu Leu His Asp	
	50 55 60	
	cct tcc ttc gaa ttc acc aat gaa tct cgt ctc tgg gtt gat cgg atg	240
	Pro Ser Phe Glu Phe Thr Asn Glu Ser Arg Leu Trp Val Asp Arg Met	
	65 70 75 80	
15	ctg gac tac aat gta cgt gga ggg aaa ctc aat cgg ggt ctc tct gtt	288
	Leu Asp Tyr Asn Val Arg Gly Gly Lys Leu Asn Arg Gly Leu Ser Val	
	85 90 95	
20	gtt gac agt ttc aaa ctt ttg aag caa ggc aat gat ttg act gag caa	336
	Val Asp Ser Phe Lys Leu Leu Lys Gln Gly Asn Asp Leu Thr Glu Gln	
	100 105 110	
	gag gtt ttc ctc tct tgt gct ctc ggt tgg tgc att gaa tgg ctc caa	384
25	Glu Val Phe Leu Ser Cys Ala Leu Gly Trp Cys Ile Glu Trp Leu Gln	
	115 120 125	
	gct tat ttc ctt gtg ctt gat gat att atg gat aac tct gtc act cgc	432
30	Ala Tyr Phe Leu Val Leu Asp Asp Ile Met Asp Asn Ser Val Thr Arg	
	130 135 140	
	cgt ggt caa cct tgc tgg ttc aga gtt cct cag gtt ggt atg gtt gcc	480
35	Arg Gly Gln Pro Cys Trp Phe Arg Val Pro Gln Val Gly Met Val Ala	
	145 150 155 160	
	atc aat gat ggg att cta ctt cgc aat cac atc cac agg att ctc aaa	528
	Ile Asn Asp Gly Ile Leu Leu Arg Asn His Ile His Arg Ile Leu Lys	
	165 170 175	
40	aag cat ttc cgt gat aag cct tac tat gtt gac ctt gtt gat ttg ttt	576
	Lys His Phe Arg Asp Lys Pro Tyr Tyr Val Asp Leu Val Asp Leu Phe	
	180 185 190	
	aat gag gtt gag ttg caa aca gct tgt ggc cag atg ata gat ttg atc	624
45	Asn Glu Val Glu Leu Gln Thr Ala Cys Gly Gln Met Ile Asp Leu Ile	
	195 200 205	
	acc acc ttt gaa gga gaa aag gat ttg gcc aag tac tca ttg tca atc	672
50	Thr Thr Phe Glu Gly Glu Lys Asp Leu Ala Lys Tyr Ser Leu Ser Ile	
	210 215 220	

<212> PRT

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

5 &lt;400&gt; 112

Met Ser Val Ser Cys Cys Cys Arg Asn Leu Gly Lys Thr Ile Lys Lys  
 1 5 10 15

10

Ala Ile Pro Ser His His Leu His Leu Arg Ser Leu Gly Gly Ser Leu  
 20 25 30

15

Tyr Arg Arg Arg Ile Gln Ser Ser Ser Met Glu Thr Asp Leu Lys Ser  
 35 40 45

20

Thr Phe Leu Asn Val Tyr Ser Val Leu Lys Ser Asp Leu Leu His Asp  
 50 55 60

25

Pro Ser Phe Glu Phe Thr Asn Glu Ser Arg Leu Trp Val Asp Arg Met  
 65 70 75 80

Leu Asp Tyr Asn Val Arg Gly Gly Lys Leu Asn Arg Gly Leu Ser Val  
 85 90 95

30

Val Asp Ser Phe Lys Leu Leu Lys Gln Gly Asn Asp Leu Thr Glu Gln  
 100 105 110

35

Glu Val Phe Leu Ser Cys Ala Leu Gly Trp Cys Ile Glu Trp Leu Gln  
 115 120 125

40

Ala Tyr Phe Leu Val Leu Asp Asp Ile Met Asp Asn Ser Val Thr Arg  
 130 135 140

45

Arg Gly Gln Pro Cys Trp Phe Arg Val Pro Gln Val Gly Met Val Ala  
 145 150 155 160

Ile Asn Asp Gly Ile Leu Leu Arg Asn His Ile His Arg Ile Leu Lys  
 165 170 175

50

167

Lys His Phe Arg Asp Lys Pro Tyr Tyr Val Asp Leu Val Asp Leu Phe  
 180 185 190

5 Asn Glu Val Glu Leu Gln Thr Ala Cys Gly Gln Met Ile Asp Leu Ile  
 195 200 205

10 Thr Thr Phe Glu Gly Glu Lys Asp Leu Ala Lys Tyr Ser Leu Ser Ile  
 210 215 220

15 His Arg Arg Ile Val Gln Tyr Lys Thr Ala Tyr Tyr Ser Phe Tyr Leu  
 225 230 235 240

Pro Val Ala Cys Ala Leu Leu Met Ala Gly Glu Asn Leu Glu Asn His  
 245 250 255

20 Ile Asp Val Lys Asn Val Leu Val Asp Met Gly Ile Tyr Phe Gln Val  
 260 265 270

25 Gln Asp Asp Tyr Leu Asp Cys Phe Ala Asp Pro Glu Thr Leu Gly Lys  
 275 280 285

30 Ile Gly Thr Asp Ile Glu Asp Phe Lys Cys Ser Trp Leu Val Val Lys  
 290 295 300

35 Ala Leu Glu Arg Cys Ser Glu Glu Gln Thr Lys Ile Leu Tyr Glu Asn  
 305 310 315 320

Tyr Gly Lys Pro Asp Pro Ser Asn Val Ala Lys Val Lys Asp Leu Tyr  
 325 330 335

40 Lys Glu Leu Asp Leu Glu Gly Val Phe Met Glu Tyr Glu Ser Lys Ser  
 340 345 350

45 Tyr Glu Lys Leu Thr Gly Ala Ile Glu Gly His Gln Ser Lys Ala Ile  
 355 360 365

50 Gln Ala Val Leu Lys Ser Phe Leu Ala Lys Ile Tyr Lys Arg Gln Lys  
 370 375 380



&lt;210&gt; 113

5 &lt;211&gt; 1101

&lt;212&gt; DNA

10 &lt;213&gt; Sinabs alba

&lt;220&gt;

15 &lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1) .. (1101)

20 &lt;223&gt;

&lt;400&gt; 113

25 atg gct tct tca gtg act cct cta ggt tca tgg gtt ctt ctt cac cat 48  
Met Ala Ser Ser Val Thr Pro Leu Gly Ser Trp Val Leu Leu His His  
1 5 10 15

30 cat cct tca act atc tta acc caa tcc aga tcc aga tct cct cct tct 96  
His Pro Ser Thr Ile Leu Thr Gln Ser Arg Ser Arg Ser Pro Pro Ser  
20 25 30

35 ctc atc acc ctt aaa ccc atc tcc ctc act cca aaa cgc acc gtt tcg 144  
Leu Ile Thr Leu Lys Pro Ile Ser Leu Thr Pro Lys Arg Thr Val Ser  
35 40 45

tct tct tcc tcc tct tcc ctc atc acc aaa gaa gac aac aac ctc aaa 192  
Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Ile Thr Lys Glu Asp Asn Asn Leu Lys  
50 55 60

40 tcc tct tcc tct tcc ttc gat ttc atg tct tac atc atc cgc aaa gcc 240  
Ser Ser Ser Ser Ser Phe Asp Phe Met Ser Tyr Ile Ile Arg Lys Ala  
65 70 75 80

45 gac tcc gtc aac aaa gcc tta gac tcc gcc gtc cct ctc cgg gag cca 288  
Asp Ser Val Asn Lys Ala Leu Asp Ser Ala Val Pro Leu Arg Glu Pro  
85 90 95

50 ctc aag atc cac gaa gcg atg cgt tac tct ctc ctc gcc gga gga aaa 336  
Leu Lys Ile His Glu Ala Met Arg Tyr Ser Leu Leu Ala Gly Gly Lys  
100 105 110

	cgc gtc aga cca gtt ctc tgc atc gcc gcg tgc gag cta gtc gga gga	384
	Arg Val Arg Pro Val Leu Cys Ile Ala Ala Cys Glu Leu Val Gly Gly	
	115 120 125	
5		
	gaa gag tct tta gct atg ccg gcg cgt tgc gcc gtg gaa atg atc cac	432
	Glu Glu Ser Leu Ala Met Pro Ala Arg Cys Ala Val Glu Met Ile His	
	130 135 140	
10		
	acc atg tcg ttg atc cac gac gac ttg cct tgt atg gat aac gac gat	480
	Thr Met Ser Leu Ile His Asp Asp Leu Pro Cys Met Asp Asn Asp Asp	
	145 150 155 160	
15		
	ctc cgc cgc gga aag ccc acg aat cac aaa gtt tac ggc gaa gac gtg	528
	Leu Arg Arg Gly Lys Pro Thr Asn His Lys Val Tyr Gly Glu Asp Val	
	165 170 175	
20		
	gcg gtt tta gcc gga gac gcg ctt ctt tcg ttc gcc ttc gag cat tta	576
	Ala Val Leu Ala Gly Asp Ala Leu Leu Ser Phe Ala Phe Glu His Leu	
	180 185 190	
25		
	gcg tcg gct acg agc tcg gag gtt tct ccg gcg aga gtg gtt aga gct	624
	Ala Ser Ala Thr Ser Ser Glu Val Ser Pro Ala Arg Val Val Arg Ala	
	195 200 205	
30		
	gtg gga gag ttg gct aaa gcc atc ggc acc gaa ggg ctc gtg gcg gga	672
	Val Gly Glu Leu Ala Lys Ala Ile Gly Thr Glu Gly Leu Val Ala Gly	
	210 215 220	
35		
	caa gtg gtg gat ata agc agt gaa ggg ttg gac tta aac aac gtc gga	720
	Gln Val Val Asp Ile Ser Ser Glu Gly Leu Asp Leu Asn Asn Val Gly	
	225 230 235 240	
40		
	ttg gag cat ttg aag ttt ata cat ttg cat aaa acg gcg gcg ttg ctt	768
	Leu Glu His Leu Lys Phe Ile His Leu His Lys Thr Ala Ala Leu Leu	
	245 250 255	
45		
	gaa gct tca gcg gtt ttg ggt ggg atc atc ggt gga ggg agt gat gaa	816
	Glu Ala Ser Ala Val Leu Gly Gly Ile Ile Gly Gly Gly Ser Asp Glu	
	260 265 270	
50		
	gag atc gag agg ctg agg aag ttc gcg agg tgt att ggg ttg ttg ttt	864
	Glu Ile Glu Arg Leu Arg Lys Phe Ala Arg Cys Ile Gly Leu Leu Phe	
	275 280 285	
55		
	cag gtg gtt gat gat atc ttg gac gtg acg aaa tcg tct caa gaa ctg	912
	Gln Val Val Asp Asp Ile Leu Asp Val Thr Lys Ser Ser Gln Glu Leu	
	290 295 300	
60		
	ggg aaa acc gct ggg aaa gat ttg att gct gat aag ttg act tat ccg	960

## 170

	Gly	Lys	Thr	Ala	Gly	Lys	Asp	Leu	Ile	Ala	Asp	Lys	Leu	Thr	Tyr	Pro	
	305					310					315					320	
5	aag	ctc	atg	ggc	ttg	gag	aaa	tcg	aga	gag	ttc	gct	gag	aag	ttg	aat	1008
	Lys	Leu	Met	Gly	Leu	Glu	Lys	Ser	Arg	Glu	Phe	Ala	Glu	Lys	Leu	Asn	
					325					330					335		
10	aca	gag	gca	cgt	gat	cag	ctt	tta	ggg	ttt	gat	tcc	gac	aag	gtt	gct	1056
	Thr	Glu	Ala	Arg	Asp	Gln	Leu	Leu	Gly	Phe	Asp	Ser	Asp	Lys	Val	Ala	
				340					345					350			
15	cct	ttg	ttg	gct	ttg	gct	aat	tac	att	gcc	aat	aga	cag	aac	tga		1101
	Pro	Leu	Leu	Ala	Leu	Ala	Asn	Tyr	Ile	Ala	Asn	Arg	Gln	Asn			
				355				360					365				
20	<210>	114															
	<211>	366															
	<212>	PRT															
	<213>	Sinabs alba															
25	<400>	114															
30	Met	Ala	Ser	Ser	Val	Thr	Pro	Leu	Gly	Ser	Trp	Val	Leu	Leu	His	His	
	1				5					10					15		
35	His	Pro	Ser	Thr	Ile	Leu	Thr	Gln	Ser	Arg	Ser	Arg	Ser	Pro	Pro	Ser	
				20					25					30			
40	Leu	Ile	Thr	Leu	Lys	Pro	Ile	Ser	Leu	Thr	Pro	Lys	Arg	Thr	Val	Ser	
				35				40					45				
	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Leu	Ile	Thr	Lys	Glu	Asp	Asn	Asn	Leu	Lys	
		50					55					60					
45	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Phe	Asp	Phe	Met	Ser	Tyr	Ile	Ile	Arg	Lys	Ala	
	65					70					75					80	
50	Asp	Ser	Val	Asn	Lys	Ala	Leu	Asp	Ser	Ala	Val	Pro	Leu	Arg	Glu	Pro	
					85					90					95		

5 Leu Lys Ile His Glu Ala Met Arg Tyr Ser Leu Leu Ala Gly Gly Lys  
 100 105 110

Arg Val Arg Pro Val Leu Cys Ile Ala Ala Cys Glu Leu Val Gly Gly  
 115 120 125

10 Glu Glu Ser Leu Ala Met Pro Ala Arg Cys Ala Val Glu Met Ile His  
 130 135 140

15 Thr Met Ser Leu Ile His Asp Asp Leu Pro Cys Met Asp Asn Asp Asp  
 145 150 155 160

20 Leu Arg Arg Gly Lys Pro Thr Asn His Lys Val Tyr Gly Glu Asp Val  
 165 170 175

25 Ala Val Leu Ala Gly Asp Ala Leu Leu Ser Phe Ala Phe Glu His Leu  
 180 185 190

Ala Ser Ala Thr Ser Ser Glu Val Ser Pro Ala Arg Val Val Arg Ala  
 195 200 205

30 Val Gly Glu Leu Ala Lys Ala Ile Gly Thr Glu Gly Leu Val Ala Gly  
 210 215 220

35 Gln Val Val Asp Ile Ser Ser Glu Gly Leu Asp Leu Asn Asn Val Gly  
 225 230 235 240

40 Leu Glu His Leu Lys Phe Ile His Leu His Lys Thr Ala Ala Leu Leu  
 245 250 255

45 Glu Ala Ser Ala Val Leu Gly Gly Ile Ile Gly Gly Gly Ser Asp Glu  
 260 265 270

Glu Ile Glu Arg Leu Arg Lys Phe Ala Arg Cys Ile Gly Leu Leu Phe  
 275 280 285

50

172

Gln Val Val Asp Asp Ile Leu Asp Val Thr Lys Ser Ser Gln Glu Leu  
290 295 300

5 Gly Lys Thr Ala Gly Lys Asp Leu Ile Ala Asp Lys Leu Thr Tyr Pro  
305 310 315 320

10 Lys Leu Met Gly Leu Glu Lys Ser Arg Glu Phe Ala Glu Lys Leu Asn  
325 330 335

15 Thr Glu Ala Arg Asp Gln Leu Leu Gly Phe Asp Ser Asp Lys Val Ala  
340 345 350

Pro Leu Leu Ala Leu Ala Asn Tyr Ile Ala Asn Arg Gln Asn  
355 360 365

20 <210> 115

<211> 930

25 <212> DNA

<213> Erwinia uredovora

30 <220>

<221> CDS

35 <222> (1)..(930)

<223>

40 <400> 115

atg aat aat ccg tcg tta ctc aat cat gcg gtc gaa acg atg gca gtt 48  
Met Asn Asn Pro Ser Leu Leu Asn His Ala Val Glu Thr Met Ala Val  
1 5 10 15

45 ggc tcg aaa agt ttt gcg aca gcc tca aag tta ttt gat gca aaa acc 96  
Gly Ser Lys Ser Phe Ala Thr Ala Ser Lys Leu Phe Asp Ala Lys Thr  
20 25 30

50 cgg cgc agc gta ctg atg ctc tac gcc tgg tgc cgc cat tgt gac gat 144

## 173

	Arg	Arg	Ser	Val	Leu	Met	Leu	Tyr	Ala	Trp	Cys	Arg	His	Cys	Asp	Asp	
	35						40						45				
5	gtt	att	gac	gat	cag	acg	ctg	ggc	ttt	cag	gcc	cgg	cag	cct	gcc	tta	192
	Val	Ile	Asp	Asp	Gln	Thr	Leu	Gly	Phe	Gln	Ala	Arg	Gln	Pro	Ala	Leu	
	50						55						60				
10	caa	acg	ccc	gaa	caa	cgt	ctg	atg	caa	ctt	gag	atg	aaa	acg	cgc	cag	240
	Gln	Thr	Pro	Glu	Gln	Arg	Leu	Met	Gln	Leu	Glu	Met	Lys	Thr	Arg	Gln	
	65					70					75				80		
15	gcc	tat	gca	gga	tgc	cag	atg	cac	gaa	ccg	gcg	ttt	gcg	gct	ttt	cag	288
	Ala	Tyr	Ala	Gly	Ser	Gln	Met	His	Glu	Pro	Ala	Phe	Ala	Ala	Phe	Gln	
	85						90						95				
	gaa	gtg	gct	atg	gct	cat	gat	atc	gcc	ccg	gct	tac	gcg	ttt	gat	cat	336
	Glu	Val	Ala	Met	Ala	His	Asp	Ile	Ala	Pro	Ala	Tyr	Ala	Phe	Asp	His	
	100						105						110				
20	ctg	gaa	ggc	ttc	gcc	atg	gat	gta	cgc	gaa	gcg	caa	tac	agc	caa	ctg	384
	Leu	Glu	Gly	Phe	Ala	Met	Asp	Val	Arg	Glu	Ala	Gln	Tyr	Ser	Gln	Leu	
	115						120						125				
25	gat	gat	acg	ctg	cgc	tat	tgc	tat	cac	gtt	gca	ggc	gtt	gtc	ggc	ttg	432
	Asp	Asp	Thr	Leu	Arg	Tyr	Cys	Tyr	His	Val	Ala	Gly	Val	Val	Gly	Leu	
	130						135					140					
30	atg	atg	gcg	caa	atc	atg	ggc	gtg	cgg	gat	aac	gcc	acg	ctg	gac	cgc	480
	Met	Met	Ala	Gln	Ile	Met	Gly	Val	Arg	Asp	Asn	Ala	Thr	Leu	Asp	Arg	
	145					150					155				160		
35	gcc	tgt	gac	ctt	ggg	ctg	gca	ttt	cag	ttg	acc	aat	att	gct	cgc	gat	528
	Ala	Cys	Asp	Leu	Gly	Leu	Ala	Phe	Gln	Leu	Thr	Asn	Ile	Ala	Arg	Asp	
	165						170						175				
	att	gtg	gac	gat	gcg	cat	gcg	ggc	cgc	tgt	tat	ctg	ccg	gca	agc	tgg	576
	Ile	Val	Asp	Asp	Ala	His	Ala	Gly	Arg	Cys	Tyr	Leu	Pro	Ala	Ser	Trp	
	180						185						190				
40	ctg	gag	cat	gaa	ggt	ctg	aac	aaa	gag	aat	tat	gcg	gca	cct	gaa	aac	624
	Leu	Glu	His	Glu	Gly	Leu	Asn	Lys	Glu	Asn	Tyr	Ala	Ala	Pro	Glu	Asn	
	195						200					205					
45	cgt	cag	gcg	ctg	agc	cgt	atc	gcc	cgt	cgt	ttg	gtg	cag	gaa	gca	gaa	672
	Arg	Gln	Ala	Leu	Ser	Arg	Ile	Ala	Arg	Arg	Leu	Val	Gln	Glu	Ala	Glu	
	210						215					220					
50	cct	tac	tat	ttg	tct	gcc	aca	gcc	ggc	ctg	gca	ggg	ttg	ccc	ctg	cgt	720
	Pro	Tyr	Tyr	Leu	Ser	Ala	Thr	Ala	Gly	Leu	Ala	Gly	Leu	Pro	Leu	Arg	
	225					230					235				240		

tcc gcc tgg gca atc gct acg gcg aag cag gtt tac cgg aaa ata ggt 768  
 Ser Ala Trp Ala Ile Ala Thr Ala Lys Gln Val Tyr Arg Lys Ile Gly  
 245 250 255

5

gtc aaa gtt gaa cag gcc ggt cag caa gcc tgg gat cag cgg cag tca 816  
 Val Lys Val Glu Gln Ala Gly Gln Gln Ala Trp Asp Gln Arg Gln Ser  
 260 265 270

10

acg acc acg ccc gaa aaa tta acg ctg ctg ctg gcc gcc tct ggt cag 864  
 Thr Thr Thr Pro Glu Lys Leu Thr Leu Leu Leu Ala Ala Ser Gly Gln  
 275 280 285

15

gcc ctt act tcc cgg atg cgg gct cat cct ccc cgc cct gcg cat ctc 912  
 Ala Leu Thr Ser Arg Met Arg Ala His Pro Pro Arg Pro Ala His Leu  
 290 295 300

20

tgg cag cgc ccg ctc tag 930  
 Trp Gln Arg Pro Leu  
 305

<210> 116

25

<211> 309  
 <212> PRT  
 <213> Erwinia uredovora

30

<400> 116

35

Met Asn Asn Pro Ser Leu Leu Asn His Ala Val Glu Thr Met Ala Val  
 1 5 10 15

40

Gly Ser Lys Ser Phe Ala Thr Ala Ser Lys Leu Phe Asp Ala Lys Thr  
 20 25 30

45

Arg Arg Ser Val Leu Met Leu Tyr Ala Trp Cys Arg His Cys Asp Asp  
 35 40 45

50

Val Ile Asp Asp Gln Thr Leu Gly Phe Gln Ala Arg Gln Pro Ala Leu  
 50 55 60

175

	Gln	Thr	Pro	Glu	Gln	Arg	Leu	Met	Gln	Leu	Glu	Met	Lys	Thr	Arg	Gln	
	65					70					75					80	
5	Ala	Tyr	Ala	Gly	Ser	Gln	Met	His	Glu	Pro	Ala	Phe	Ala	Ala	Phe	Gln	
					85					90					95		
10	Glu	Val	Ala	Met	Ala	His	Asp	Ile	Ala	Pro	Ala	Tyr	Ala	Phe	Asp	His	
				100					105					110			
15	Leu	Glu	Gly	Phe	Ala	Met	Asp	Val	Arg	Glu	Ala	Gln	Tyr	Ser	Gln	Leu	
			115					120					125				
	Asp	Asp	Thr	Leu	Arg	Tyr	Cys	Tyr	His	Val	Ala	Gly	Val	Val	Gly	Leu	
	130						135					140					
20	Met	Met	Ala	Gln	Ile	Met	Gly	Val	Arg	Asp	Asn	Ala	Thr	Leu	Asp	Arg	
	145					150					155					160	
25	Ala	Cys	Asp	Leu	Gly	Leu	Ala	Phe	Gln	Leu	Thr	Asn	Ile	Ala	Arg	Asp	
				165						170					175		
30	Ile	Val	Asp	Asp	Ala	His	Ala	Gly	Arg	Cys	Tyr	Leu	Pro	Ala	Ser	Trp	
			180						185					190			
35	Leu	Glu	His	Glu	Gly	Leu	Asn	Lys	Glu	Asn	Tyr	Ala	Ala	Pro	Glu	Asn	
			195					200					205				
	Arg	Gln	Ala	Leu	Ser	Arg	Ile	Ala	Arg	Arg	Leu	Val	Gln	Glu	Ala	Glu	
	210						215					220					
40	Pro	Tyr	Tyr	Leu	Ser	Ala	Thr	Ala	Gly	Leu	Ala	Gly	Leu	Pro	Leu	Arg	
	225					230					235					240	
45	Ser	Ala	Trp	Ala	Ile	Ala	Thr	Ala	Lys	Gln	Val	Tyr	Arg	Lys	Ile	Gly	
				245						250					255		
50	Val	Lys	Val	Glu	Gln	Ala	Gly	Gln	Gln	Ala	Trp	Asp	Gln	Arg	Gln	Ser	
			260						265					270			



Thr Thr Thr Pro Glu Lys Leu Thr Leu Leu Leu Ala Ala Ser Gly Gln  
 275 280 285  
 5  
 Ala Leu Thr Ser Arg Met Arg Ala His Pro Pro Arg Pro Ala His Leu  
 290 295 300  
 10  
 Trp Gln Arg Pro Leu  
 305  
 15 <210> 117  
 <211> 1479  
 <212> DNA  
 20 <213> Erwinia uredovora  
 25 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1479)  
 30 <223>  
 35 <400> 117  
 atg aaa cca act acg gta att ggt gca ggc ttc ggt ggc ctg gca ctg 48  
 Met Lys Pro Thr Thr Val Ile Gly Ala Gly Phe Gly Gly Leu Ala Leu  
 1 5 10 15  
 40 gca att cgt cta caa gct gcg ggg atc ccc gtc tta ctg ctt gaa caa 96  
 Ala Ile Arg Leu Gln Ala Ala Gly Ile Pro Val Leu Leu Leu Glu Gln  
 20 25 30  
 cgt gat aaa ccc ggc ggt cgg gct tat gtc tac gag gat cag ggg ttt 144  
 45 Arg Asp Lys Pro Gly Gly Arg Ala Tyr Val Tyr Glu Asp Gln Gly Phe  
 35 40 45  
 acc ttt gat gca ggc ccg acg gtt atc acc gat ccc agt gcc att gaa 192  
 Thr Phe Asp Ala Gly Pro Thr Val Ile Thr Asp Pro Ser Ala Ile Glu  
 50 55 60



	Val	His	Leu	Glu	Asp	Gly	Arg	Arg	Phe	Leu	Thr	Gln	Ala	Val	Ala	Ser	
				260					265					270			
5	aat	gca	gat	gtg	gtt	cat	acc	tat	cgc	gac	ctg	tta	agc	cag	cac	cct	864
	Asn	Ala	Asp	Val	Val	His	Thr	Tyr	Arg	Asp	Leu	Leu	Ser	Gln	His	Pro	
			275					280					285				
10	gcc	gcg	gtt	aag	cag	tcc	aac	aaa	ctg	cag	act	aag	cgc	atg	agt	aac	912
	Ala	Ala	Val	Lys	Gln	Ser	Asn	Lys	Leu	Gln	Thr	Lys	Arg	Met	Ser	Asn	
			290					295					300				
15	tct	ctg	ttt	gtg	ctc	tat	ttt	ggg	ttg	aat	cac	cat	cat	gat	cag	ctc	960
	Ser	Leu	Phe	Val	Leu	Tyr	Phe	Gly	Leu	Asn	His	His	His	Asp	Gln	Leu	
	305					310					315					320	
20	gaa	att	ttt	aat	cat	gat	ggc	ctc	gca	gag	gac	ttc	tca	ctt	tat	ctg	1056
	Glu	Ile	Phe	Asn	His	Asp	Gly	Leu	Ala	Glu	Asp	Phe	Ser	Leu	Tyr	Leu	
				340					345					350			
25	cac	gcg	ccc	tgt	gtc	acg	gat	tgc	tca	ctg	gcg	cct	gaa	ggg	tgc	ggc	1104
	His	Ala	Pro	Cys	Val	Thr	Asp	Ser	Ser	Leu	Ala	Pro	Glu	Gly	Cys	Gly	
			355					360					365				
30	agt	tac	tat	gtg	ttg	gcg	ccg	gtg	ccg	cat	tta	ggc	acc	gcg	aac	ctc	1152
	Ser	Tyr	Tyr	Val	Leu	Ala	Pro	Val	Pro	His	Leu	Gly	Thr	Ala	Asn	Leu	
		370					375					380					
35	gac	tgg	acg	gtt	gag	ggg	cca	aaa	cta	cgc	gac	cgt	att	ttt	gcg	tac	1200
	Asp	Trp	Thr	Val	Glu	Gly	Pro	Lys	Leu	Arg	Asp	Arg	Ile	Phe	Ala	Tyr	
	385					390					395					400	
40	ctt	gag	cag	cat	tac	atg	cct	ggc	tta	cgg	agt	cag	ctg	gtc	acg	cac	1248
	Leu	Glu	Gln	His	Tyr	Met	Pro	Gly	Leu	Arg	Ser	Gln	Leu	Val	Thr	His	
				405						410					415		
45	cgg	atg	ttt	acg	ccg	ttt	gat	ttt	cgc	gac	cag	ctt	aat	gcc	tat	cat	1296
	Arg	Met	Phe	Thr	Pro	Phe	Asp	Phe	Arg	Asp	Gln	Leu	Asn	Ala	Tyr	His	
				420					425					430			
50	ggc	tca	gcc	ttt	tct	gtg	gag	ccc	gtt	ctt	acc	cag	agc	gcc	tgg	ttt	1344
	Gly	Ser	Ala	Phe	Ser	Val	Glu	Pro	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Ala	Trp	Phe	
			435					440					445				
50	cgg	ccg	cat	aac	cgc	gat	aaa	acc	att	act	aat	ctc	tac	ctg	gtc	ggc	1392
	Arg	Pro	His	Asn	Arg	Asp	Lys	Thr	Ile	Thr	Asn	Leu	Tyr	Leu	Val	Gly	
			450				455					460					

gca ggc acg cat ccc ggc gca ggc att cct ggc gtc atc ggc tcg gca 1440  
 Ala Gly Thr His Pro Gly Ala Gly Ile Pro Gly Val Ile Gly Ser Ala  
 465 470 475 480

5

aaa gcg aca gca ggt ttg atg ctg gag gat ctg ata tga 1479  
 Lys Ala Thr Ala Gly Leu Met Leu Glu Asp Leu Ile  
 485 490

10

&lt;210&gt; 118

&lt;211&gt; 492

15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Erwinia uredovora

20

&lt;400&gt; 118

Met Lys Pro Thr Thr Val Ile Gly Ala Gly Phe Gly Gly Leu Ala Leu  
 1 5 10 15

25

Ala Ile Arg Leu Gln Ala Ala Gly Ile Pro Val Leu Leu Leu Glu Gln  
 20 25 30

30

Arg Asp Lys Pro Gly Gly Arg Ala Tyr Val Tyr Glu Asp Gln Gly Phe  
 35 40 45

35

Thr Phe Asp Ala Gly Pro Thr Val Ile Thr Asp Pro Ser Ala Ile Glu  
 50 55 60

40

Glu Leu Phe Ala Leu Ala Gly Lys Gln Leu Lys Glu Tyr Val Glu Leu  
 65 70 75 80

45

Leu Pro Val Thr Pro Phe Tyr Arg Leu Cys Trp Glu Ser Gly Lys Val  
 85 90 95

Phe Asn Tyr Asp Asn Asp Gln Thr Arg Leu Glu Ala Gln Ile Gln Gln  
 100 105 110

50

## 180

	Phe	Asn	Pro	Arg	Asp	Val	Glu	Gly	Tyr	Arg	Gln	Phe	Leu	Asp	Tyr	Ser
		115						120					125			
5	Arg	Ala	Val	Phe	Lys	Glu	Gly	Tyr	Leu	Lys	Leu	Gly	Thr	Val	Pro	Phe
	130						135					140				
10	Leu	Ser	Phe	Arg	Asp	Met	Leu	Arg	Ala	Ala	Pro	Gln	Leu	Ala	Lys	Leu
	145					150					155					160
15	Gln	Ala	Trp	Arg	Ser	Val	Tyr	Ser	Lys	Val	Ala	Ser	Tyr	Ile	Glu	Asp
					165					170					175	
20	Glu	His	Leu	Arg	Gln	Ala	Phe	Ser	Phe	His	Ser	Leu	Leu	Val	Gly	Gly
			180						185					190		
25	Asn	Pro	Phe	Ala	Thr	Ser	Ser	Ile	Tyr	Thr	Leu	Ile	His	Ala	Leu	Glu
			195					200					205			
30	Arg	Glu	Trp	Gly	Val	Trp	Phe	Pro	Arg	Gly	Gly	Thr	Gly	Ala	Leu	Val
	210						215					220				
35	Gln	Gly	Met	Ile	Lys	Leu	Phe	Gln	Asp	Leu	Gly	Gly	Glu	Val	Val	Leu
	225					230					235					240
40	Asn	Ala	Arg	Val	Ser	His	Met	Glu	Thr	Thr	Gly	Asn	Lys	Ile	Glu	Ala
					245					250					255	
45	Val	His	Leu	Glu	Asp	Gly	Arg	Arg	Phe	Leu	Thr	Gln	Ala	Val	Ala	Ser
			260						265					270		
50	Asn	Ala	Asp	Val	Val	His	Thr	Tyr	Arg	Asp	Leu	Leu	Ser	Gln	His	Pro
		275						280					285			
55	Ala	Ala	Val	Lys	Gln	Ser	Asn	Lys	Leu	Gln	Thr	Lys	Arg	Met	Ser	Asn
	290						295					300				
60	Ser	Leu	Phe	Val	Leu	Tyr	Phe	Gly	Leu	Asn	His	His	His	Asp	Gln	Leu
	305					310					315				320	

Ala His His Thr Val Cys Phe Gly Pro Arg Tyr Arg Glu Leu Ile Asp  
325 330 335

5

Glu Ile Phe Asn His Asp Gly Leu Ala Glu Asp Phe Ser Leu Tyr Leu  
340 345 350

10

His Ala Pro Cys Val Thr Asp Ser Ser Leu Ala Pro Glu Gly Cys Gly  
355 360 365

15

Ser Tyr Tyr Val Leu Ala Pro Val Pro His Leu Gly Thr Ala Asn Leu  
370 375 380

20

Asp Trp Thr Val Glu Gly Pro Lys Leu Arg Asp Arg Ile Phe Ala Tyr  
385 390 395 400

25

Leu Glu Gln His Tyr Met Pro Gly Leu Arg Ser Gln Leu Val Thr His  
405 410 415

30

Arg Met Phe Thr Pro Phe Asp Phe Arg Asp Gln Leu Asn Ala Tyr His  
420 425 430

35

Arg Pro His Asn Arg Asp Lys Thr Ile Thr Asn Leu Tyr Leu Val Gly  
450 455 460

40

Ala Gly Thr His Pro Gly Ala Gly Ile Pro Gly Val Ile Gly Ser Ala  
465 470 475 480

45

Lys Ala Thr Ala Gly Leu Met Leu Glu Asp Leu Ile  
485 490

<210> 119

<211> 1725

50

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Narcissus pseudonarcissus

5

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

10

&lt;222&gt; (1)..(1725)

&lt;223&gt;

15

&lt;400&gt; 119

	atg gct tct tcc act tgt tta att cat tct tcc tct ttt ggg gtt gga	48
	Met Ala Ser Ser Thr Cys Leu Ile His Ser Ser Ser Phe Gly Val Gly	
20	1 5 10 15	
	gga aag aaa gtg aag atg aac acg atg att cga tcg aag ttg ttt tca	96
	Gly Lys Lys Val Lys Met Asn Thr Met Ile Arg Ser Lys Leu Phe Ser	
	20 25 30	
25	att cgg tcg gct ttg gac act aag gtg tct gat atg agc gtc aat gct	144
	Ile Arg Ser Ala Leu Asp Thr Lys Val Ser Asp Met Ser Val Asn Ala	
	35 40 45	
30	cca aaa gga ttg ttt cca cca gag cct gag cac tac agg ggg cca aag	192
	Pro Lys Gly Leu Phe Pro Pro Glu Pro Glu His Tyr Arg Gly Pro Lys	
	50 55 60	
	ctt aaa gtg gct atc att gga gct ggg ctc gct ggc atg tca act gca	240
35	Leu Lys Val Ala Ile Ile Gly Ala Gly Leu Ala Gly Met Ser Thr Ala	
	65 70 75 80	
	gtg gag ctt ttg gat caa ggg cat gag gtt gac ata tat gaa tcc aga	288
	Val Glu Leu Leu Asp Gln Gly His Glu Val Asp Ile Tyr Glu Ser Arg	
40	85 90 95	
	caa ttt att ggt ggt aaa gtc ggt tct ttt gta gat aag cgt gga aac	336
	Gln Phe Ile Gly Gly Lys Val Gly Ser Phe Val Asp Lys Arg Gly Asn	
	100 105 110	
45	cat att gaa atg gga ctc cat gtg ttt ttt ggt tgc tat aac aat ctt	384
	His Ile Glu Met Gly Leu His Val Phe Phe Gly Cys Tyr Asn Asn Leu	
	115 120 125	
50	ttc aga ctt atg aaa aag gta ggt gca gat gaa aat tta ctg gtg aag	432

## 183

	Phe	Arg	Leu	Met	Lys	Lys	Val	Gly	Ala	Asp	Glu	Asn	Leu	Leu	Val	Lys	
	130						135					140					
5	gat	cat	act	cat	acc	ttt	gta	aac	cga	ggt	gga	gaa	att	ggt	gaa	ctt	480
	Asp	His	Thr	His	Thr	Phe	Val	Asn	Arg	Gly	Gly	Glu	Ile	Gly	Glu	Leu	
	145					150					155					160	
10	gat	ttc	cga	ctt	ccg	atg	ggt	gca	cca	tta	cat	ggt	att	cgt	gca	ttt	528
	Asp	Phe	Arg	Leu	Pro	Met	Gly	Ala	Pro	Leu	His	Gly	Ile	Arg	Ala	Phe	
					165				170						175		
15	cta	aca	act	aat	caa	ctg	aag	cct	tat	gat	aaa	gca	agg	aat	gct	gtg	576
	Leu	Thr	Thr	Asn	Gln	Leu	Lys	Pro	Tyr	Asp	Lys	Ala	Arg	Asn	Ala	Val	
				180					185					190			
	gct	ctt	gcc	ctt	agc	cca	gtt	gta	cgt	gct	ctt	att	gat	cca	aat	ggt	624
	Ala	Leu	Ala	Leu	Ser	Pro	Val	Val	Arg	Ala	Leu	Ile	Asp	Pro	Asn	Gly	
			195					200					205				
20	gca	atg	cag	gat	ata	agg	aac	tta	gat	aat	att	agc	ttt	tct	gat	tgg	672
	Ala	Met	Gln	Asp	Ile	Arg	Asn	Leu	Asp	Asn	Ile	Ser	Phe	Ser	Asp	Trp	
	210						215					220					
25	ttc	tta	tcc	aaa	ggc	ggt	acc	cgc	atg	agc	atc	caa	agg	atg	tgg	gat	720
	Phe	Leu	Ser	Lys	Gly	Gly	Thr	Arg	Met	Ser	Ile	Gln	Arg	Met	Trp	Asp	
	225					230					235					240	
30	cca	gtt	gct	tat	gcc	ctc	gga	ttt	att	gac	tgt	gat	aat	atc	agt	gcc	768
	Pro	Val	Ala	Tyr	Ala	Leu	Gly	Phe	Ile	Asp	Cys	Asp	Asn	Ile	Ser	Ala	
					245					250					255		
35	cgt	tgt	atg	ctt	act	ata	ttt	tct	cta	ttt	gct	act	aag	aca	gaa	gct	816
	Arg	Cys	Met	Leu	Thr	Ile	Phe	Ser	Leu	Phe	Ala	Thr	Lys	Thr	Glu	Ala	
				260					265					270			
	tct	ctg	ttg	cgt	atg	ttg	aag	ggt	tcg	cct	gat	gtt	tac	tta	agc	ggt	864
	Ser	Leu	Leu	Arg	Met	Leu	Lys	Gly	Ser	Pro	Asp	Val	Tyr	Leu	Ser	Gly	
			275					280					285				
40	cct	ata	aga	aag	tat	att	aca	gat	aaa	ggt	gga	agg	ttt	cac	cta	agg	912
	Pro	Ile	Arg	Lys	Tyr	Ile	Thr	Asp	Lys	Gly	Gly	Arg	Phe	His	Leu	Arg	
	290						295					300					
45	tgg	ggg	tgt	aga	gag	ata	ctt	tat	gat	gaa	cta	tca	aat	ggc	gac	aca	960
	Trp	Gly	Cys	Arg	Glu	Ile	Leu	Tyr	Asp	Glu	Leu	Ser	Asn	Gly	Asp	Thr	
	305					310					315					320	
50	tat	atc	aca	ggc	att	gca	atg	tcg	aag	gct	acc	aat	aaa	aaa	ctt	gtg	1008
	Tyr	Ile	Thr	Gly	Ile	Ala	Met	Ser	Lys	Ala	Thr	Asn	Lys	Lys	Leu	Val	
				325						330					335		



	aaa gct gac gtg tat gtt gca gca tgt gat gtt cct gga ata aaa agg	1056
	Lys Ala Asp Val Tyr Val Ala Ala Cys Asp Val Pro Gly Ile Lys Arg	
	340 345 350	
5	ttg atc cca tcg gag tgg aga gaa tgg gat cta ttt gac aat atc tat	1104
	Leu Ile Pro Ser Glu Trp Arg Glu Trp Asp Leu Phe Asp Asn Ile Tyr	
	355 360 365	
10	aaa cta gtt gga gtt cca gtt gtc act gtt cag ctt agg tac aat ggt	1152
	Lys Leu Val Gly Val Pro Val Val Thr Val Gln Leu Arg Tyr Asn Gly	
	370 375 380	
15	tgg gtg aca gag atg caa gat ctg gaa aaa tca agg cag ttg aga gct	1200
	Trp Val Thr Glu Met Gln Asp Leu Glu Lys Ser Arg Gln Leu Arg Ala	
	385 390 395 400	
20	gca gta gga ttg gat aat ctt ctt tat act cca gat gca gac ttt tct	1248
	Ala Val Gly Leu Asp Asn Leu Leu Tyr Thr Pro Asp Ala Asp Phe Ser	
	405 410 415	
	tgt ttt tct gat ctt gca ctc tcg tcg cct gaa gat tat tat att gaa	1296
	Cys Phe Ser Asp Leu Ala Leu Ser Ser Pro Glu Asp Tyr Tyr Ile Glu	
	420 425 430	
25	gga caa ggg tcc cta ata cag gct gtt ctc acg cca ggg gat cca tac	1344
	Gly Gln Gly Ser Leu Ile Gln Ala Val Leu Thr Pro Gly Asp Pro Tyr	
	435 440 445	
30	atg ccc cta cct aat gat gca att ata gaa aga gtt cgg aaa cag gtt	1392
	Met Pro Leu Pro Asn Asp Ala Ile Ile Glu Arg Val Arg Lys Gln Val	
	450 455 460	
35	ttg gat tta ttc cca tcc tct caa ggc ctg gaa gtt cta tgg tct tcg	1440
	Leu Asp Leu Phe Pro Ser Ser Gln Gly Leu Glu Val Leu Trp Ser Ser	
	465 470 475 480	
40	gtg gtt aaa atc gga caa tcc cta tat cgg gag ggg cct gga aag gac	1488
	Val Val Lys Ile Gly Gln Ser Leu Tyr Arg Glu Gly Pro Gly Lys Asp	
	485 490 495	
45	cca ttc aga cct gat cag aag aca cca gta aaa aat ttc ttc ctt gca	1536
	Pro Phe Arg Pro Asp Gln Lys Thr Pro Val Lys Asn Phe Phe Leu Ala	
	500 505 510	
	ggg tca tac acc aaa cag gat tac att gac agt atg gaa gga gcg acc	1584
	Gly Ser Tyr Thr Lys Gln Asp Tyr Ile Asp Ser Met Glu Gly Ala Thr	
	515 520 525	
50	cta tcg ggg aga caa gca gct gca tat atc tgc agc gcc ggt gaa gat	1632

185

Leu Ser Gly Arg Gln Ala Ala Ala Tyr Ile Cys Ser Ala Gly Glu Asp  
 530 535 540

5 ctg gca gca ctt cgc aag aag atc gct gct gat cat cca gag caa ctg 1680  
 Leu Ala Ala Leu Arg Lys Lys Ile Ala Ala Asp His Pro Glu Gln Leu  
 545 550 555 560

10 atc aac aaa gat tct aac gtg tcg gat gaa ctg agt ctc gta taa 1725  
 Ile Asn Lys Asp Ser Asn Val Ser Asp Glu Leu Ser Leu Val  
 565 570

<210> 120

15 <211> 574

<212> PRT

20 <213> Narcissus pseudonarcissus

<400> 120

25 Met Ala Ser Ser Thr Cys Leu Ile His Ser Ser Ser Phe Gly Val Gly  
 1 5 10 15

30 Gly Lys Lys Val Lys Met Asn Thr Met Ile Arg Ser Lys Leu Phe Ser  
 20 25 30

35 Ile Arg Ser Ala Leu Asp Thr Lys Val Ser Asp Met Ser Val Asn Ala  
 35 40 45

Pro Lys Gly Leu Phe Pro Pro Glu Pro Glu His Tyr Arg Gly Pro Lys  
 50 55 60

40 Leu Lys Val Ala Ile Ile Gly Ala Gly Leu Ala Gly Met Ser Thr Ala  
 65 70 75 80

45 Val Glu Leu Leu Asp Gln Gly His Glu Val Asp Ile Tyr Glu Ser Arg  
 85 90 95

50 Gln Phe Ile Gly Gly Lys Val Gly Ser Phe Val Asp Lys Arg Gly Asn  
 100 105 110

5 His Ile Glu Met Gly Leu His Val Phe Phe Gly Cys Tyr Asn Asn Leu  
 115 120 125

Phe Arg Leu Met Lys Lys Val Gly Ala Asp Glu Asn Leu Leu Val Lys  
 130 135 140

10 Asp His Thr His Thr Phe Val Asn Arg Gly Gly Glu Ile Gly Glu Leu  
 145 150 155 160

15 Asp Phe Arg Leu Pro Met Gly Ala Pro Leu His Gly Ile Arg Ala Phe  
 165 170 175

20 Leu Thr Thr Asn Gln Leu Lys Pro Tyr Asp Lys Ala Arg Asn Ala Val  
 180 185 190

25 Ala Leu Ala Leu Ser Pro Val Val Arg Ala Leu Ile Asp Pro Asn Gly  
 195 200 205

Ala Met Gln Asp Ile Arg Asn Leu Asp Asn Ile Ser Phe Ser Asp Trp  
 210 215 220

30 Phe Leu Ser Lys Gly Gly Thr Arg Met Ser Ile Gln Arg Met Trp Asp  
 225 230 235 240

35 Pro Val Ala Tyr Ala Leu Gly Phe Ile Asp Cys Asp Asn Ile Ser Ala  
 245 250 255

40 Arg Cys Met Leu Thr Ile Phe Ser Leu Phe Ala Thr Lys Thr Glu Ala  
 260 265 270

45 Ser Leu Leu Arg Met Leu Lys Gly Ser Pro Asp Val Tyr Leu Ser Gly  
 275 280 285

Pro Ile Arg Lys Tyr Ile Thr Asp Lys Gly Gly Arg Phe His Leu Arg  
 290 295 300

## 187

	Trp Gly Cys Arg Glu Ile Leu Tyr Asp Glu Leu Ser Asn Gly Asp Thr	
	305	310 315 320
5	Tyr Ile Thr Gly Ile Ala Met Ser Lys Ala Thr Asn Lys Lys Leu Val	
	325	330 335
10	Lys Ala Asp Val Tyr Val Ala Ala Cys Asp Val Pro Gly Ile Lys Arg	
	340	345 350
15	Leu Ile Pro Ser Glu Trp Arg Glu Trp Asp Leu Phe Asp Asn Ile Tyr	
	355	360 365
20	Lys Leu Val Gly Val Pro Val Val Thr Val Gln Leu Arg Tyr Asn Gly	
	370	375 380
25	Trp Val Thr Glu Met Gln Asp Leu Glu Lys Ser Arg Gln Leu Arg Ala	
	385	390 395 400
30	Ala Val Gly Leu Asp Asn Leu Leu Tyr Thr Pro Asp Ala Asp Phe Ser	
	405	410 415
35	Cys Phe Ser Asp Leu Ala Leu Ser Ser Pro Glu Asp Tyr Tyr Ile Glu	
	420	425 430
40	Gly Gln Gly Ser Leu Ile Gln Ala Val Leu Thr Pro Gly Asp Pro Tyr	
	435	440 445
45	Met Pro Leu Pro Asn Asp Ala Ile Ile Glu Arg Val Arg Lys Gln Val	
	450	455 460
50	Leu Asp Leu Phe Pro Ser Ser Gln Gly Leu Glu Val Leu Trp Ser Ser	
	465	470 475 480
55	Val Val Lys Ile Gly Gln Ser Leu Tyr Arg Glu Gly Pro Gly Lys Asp	
	485	490 495
60	Pro Phe Arg Pro Asp Gln Lys Thr Pro Val Lys Asn Phe Phe Leu Ala	
	500	505 510

Gly Ser Tyr Thr Lys Gln Asp Tyr Ile Asp Ser Met Glu Gly Ala Thr  
 515 520 525  
 5

Leu Ser Gly Arg Gln Ala Ala Ala Tyr Ile Cys Ser Ala Gly Glu Asp  
 530 535 540

10  
 Leu Ala Ala Leu Arg Lys Lys Ile Ala Ala Asp His Pro Glu Gln Leu  
 545 550 555 560

15 Ile Asn Lys Asp Ser Asn Val Ser Asp Glu Leu Ser Leu Val  
 565 570

20  
 <210> 121  
 <211> 1848  
 <212> DNA

25 <213> Lycopersicon esculentum

30  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1) .. (1848)

35 <223>

40  
 <400> 121  
 atg tgt acc ttg agt ttt atg tat cct aat tca ctt ctt gat ggt acc 48  
 Met Cys Thr Leu Ser Phe Met Tyr Pro Asn Ser Leu Leu Asp Gly Thr  
 1 5 10 15

45  
 tgc aag act gta gct ttg ggt gat agc aaa cca aga tac aat aaa cag 96  
 Cys Lys Thr Val Ala Leu Gly Asp Ser Lys Pro Arg Tyr Asn Lys Gln  
 20 25 30

50  
 aga agt tct tgt ttt gac cct ttg ata att gga aat tgt act gat cag 144  
 Arg Ser Ser Cys Phe Asp Pro Leu Ile Ile Gly Asn Cys Thr Asp Gln  
 35 40 45

	cag cag ctt tgt ggc ttg agt tgg ggg gtg gac aag gct aag gga aga	192
	Gln Gln Leu Cys Gly Leu Ser Trp Gly Val Asp Lys Ala Lys Gly Arg	
	50 55 60	
5	aga ggg ggt act gtt tcc aat ttg aaa gca gtt gta gat gta gac aaa	240
	Arg Gly Gly Thr Val Ser Asn Leu Lys Ala Val Val Asp Val Asp Lys	
	65 70 75 80	
10	aga gtg gag agc tat ggc agt agt gat gta gaa gga aat gag agt ggc	288
	Arg Val Glu Ser Tyr Gly Ser Ser Asp Val Glu Gly Asn Glu Ser Gly	
	85 90 95	
15	agc tat gat gcc att gtt ata ggt tca gga ata ggt gga ttg gtg gca	336
	Ser Tyr Asp Ala Ile Val Ile Gly Ser Gly Ile Gly Gly Leu Val Ala	
	100 105 110	
20	gcg acg cag ctg gcg gtt aag gga gct aag gtt tta gtt ctg gag aag	384
	Ala Thr Gln Leu Ala Val Lys Gly Ala Lys Val Leu Val Leu Glu Lys	
	115 120 125	
25	tat gtt att cct ggt gga agc tct ggc ttt tac gag agg gat ggt tat	432
	Tyr Val Ile Pro Gly Gly Ser Ser Gly Phe Tyr Glu Arg Asp Gly Tyr	
	130 135 140	
30	aag ttt gat gtt ggt tca tca gtg atg ttt gga ttc agt gat aag gga	480
	Lys Phe Asp Val Gly Ser Ser Val Met Phe Gly Phe Ser Asp Lys Gly	
	145 150 155 160	
35	aac ctc aat tta att act caa gca ttg gca gca gta gga cgt aaa tta	528
	Asn Leu Asn Leu Ile Thr Gln Ala Leu Ala Ala Val Gly Arg Lys Leu	
	165 170 175	
40	gaa gtt ata cct gac cca aca act gta cat ttc cac ctg cca aat gac	576
	Glu Val Ile Pro Asp Pro Thr Thr Val His Phe His Leu Pro Asn Asp	
	180 185 190	
45	ctt tct gtt cgt ata cac cga gag tat gat gac ttc att gaa gag ctt	624
	Leu Ser Val Arg Ile His Arg Glu Tyr Asp Asp Phe Ile Glu Glu Leu	
	195 200 205	
50	gtg agt aaa ttt cca cat gaa aag gaa ggg att atc aaa ttt tac agt	672
	Val Ser Lys Phe Pro His Glu Lys Glu Gly Ile Ile Lys Phe Tyr Ser	
	210 215 220	
55	gaa tgc tgg aag atc ttt aat tct ctg aat tca ttg gaa ctg aag tct	720
	Glu Cys Trp Lys Ile Phe Asn Ser Leu Asn Ser Leu Glu Leu Lys Ser	
	225 230 235 240	
60	ttg gag gaa ccc atc tac ctt ttt ggc cag ttc ttt aag aag ccc ctt	768

## 190

	Leu Glu Glu Pro Ile Tyr Leu Phe Gly Gln Phe Phe Lys Lys Pro Leu	
	245 250 255	
5	gaa tgc ttg act ctt gcc tac tat ttg ccc cag aat gct ggt agc atc Glu Cys Leu Thr Leu Ala Tyr Tyr Leu Pro Gln Asn Ala Gly Ser Ile	816
	260 265 270	
10	gct cgg aag tat ata aga gat cct ggg ttg ctg tct ttt ata gat gca Ala Arg Lys Tyr Ile Arg Asp Pro Gly Leu Leu Ser Phe Ile Asp Ala	864
	275 280 285	
15	gag tgc ttt atc gtg agt aca gtt aat gca tta caa aca cca atg atc Glu Cys Phe Ile Val Ser Thr Val Asn Ala Leu Gln Thr Pro Met Ile	912
	290 295 300	
20	aat gca agc atg gtt cta tgt gac aga cat ttt ggc gga atc aac tac Asn Ala Ser Met Val Leu Cys Asp Arg His Phe Gly Gly Ile Asn Tyr	960
	305 310 315 320	
25	ccc gtt ggt gga gtt ggc gag atc gcc aaa tcc tta gca aaa ggc ttg Pro Val Gly Gly Val Gly Glu Ile Ala Lys Ser Leu Ala Lys Gly Leu	1008
	325 330 335	
30	gat gat cac gga agt cag ata ctt tat agg gca aat gtt aca agt atc Asp Asp His Gly Ser Gln Ile Leu Tyr Arg Ala Asn Val Thr Ser Ile	1056
	340 345 350	
35	att ttg gac aat ggc aaa gct gtg gga gtg aag ctt tct gac ggg agg Ile Leu Asp Asn Gly Lys Ala Val Gly Val Lys Leu Ser Asp Gly Arg	1104
	355 360 365	
40	aag ttt tat gct aaa acc ata gta tcg aat gct acc aga tgg gat act Lys Phe Tyr Ala Lys Thr Ile Val Ser Asn Ala Thr Arg Trp Asp Thr	1152
	370 375 380	
45	ttt gga aag ctt tta aaa gct gag aat ctg cca aaa gaa gaa gaa aat Phe Gly Lys Leu Leu Lys Ala Glu Asn Leu Pro Lys Glu Glu Glu Asn	1200
	385 390 395 400	
50	ttc cag aaa gct tat gta aaa gca cct tct ttt ctt tct att cat atg Phe Gln Lys Ala Tyr Val Lys Ala Pro Ser Phe Leu Ser Ile His Met	1248
	405 410 415	
55	gga gtt aaa gca gat gta ctc cca cca gac aca gat tgt cac cat ttt Gly Val Lys Ala Asp Val Leu Pro Pro Asp Thr Asp Cys His His Phe	1296
	420 425 430	
60	gtc ctc gag gat gat tgg aca aat ttg gag aaa cca tat gga agt ata Val Leu Glu Asp Asp Trp Thr Asn Leu Glu Lys Pro Tyr Gly Ser Ile	1344
	435 440 445	

	ttc ttg agt att cca aca gtt ctt gat tcc tca ttg gcc cca gaa gga	1392
	Phe Leu Ser Ile Pro Thr Val Leu Asp Ser Ser Leu Ala Pro Glu Gly	
	450 455 460	
5		
	cac cat att ctt cac att ttt aca aca tcg agc att gaa gat tgg gag	1440
	His His Ile Leu His Ile Phe Thr Thr Ser Ser Ile Glu Asp Trp Glu	
	465 470 475 480	
10		
	gga ctc tct ccg aaa gac tat gaa gcg aag aaa gag gtt gtt gct gaa	1488
	Gly Leu Ser Pro Lys Asp Tyr Glu Ala Lys Lys Glu Val Val Ala Glu	
	485 490 495	
15		
	agg att ata agc aga ctt gaa aaa aca ctc ttc cca ggg ctt aag tca	1536
	Arg Ile Ile Ser Arg Leu Glu Lys Thr Leu Phe Pro Gly Leu Lys Ser	
	500 505 510	
20		
	tct att ctc ttt aag gag gtg gga act cca aag acc cac aga cga tac	1584
	Ser Ile Leu Phe Lys Glu Val Gly Thr Pro Lys Thr His Arg Arg Tyr	
	515 520 525	
25		
	ctt gct cgt gat agt ggt acc tat gga cca atg cca cgc gga aca cct	1632
	Leu Ala Arg Asp Ser Gly Thr Tyr Gly Pro Met Pro Arg Gly Thr Pro	
	530 535 540	
30		
	aag gga ctc ctg gga atg cct ttc aat acc act gct ata gat ggt cta	1680
	Lys Gly Leu Leu Gly Met Pro Phe Asn Thr Thr Ala Ile Asp Gly Leu	
	545 550 555 560	
35		
	tat tgt gtt ggc gat agt tgc ttc cca gga caa ggt gtt ata gct gta	1728
	Tyr Cys Val Gly Asp Ser Cys Phe Pro Gly Gln Gly Val Ile Ala Val	
	565 570 575	
40		
	gcc ttt tca gga gta atg tgc gct cat cgt gtt gca gct gac tta ggg	1776
	Ala Phe Ser Gly Val Met Cys Ala His Arg Val Ala Ala Asp Leu Gly	
	580 585 590	
45		
	ttt gaa aaa aaa tca gat gtg ctg gac agt gct ctt ctt aga cta ctt	1824
	Phe Glu Lys Lys Ser Asp Val Leu Asp Ser Ala Leu Leu Arg Leu Leu	
	595 600 605	
50		
	ggt tgg tta agg aca cta gca tga	1848
	Gly Trp Leu Arg Thr Leu Ala	
	610 615	
	<210> 122	
	<211> 615	



&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Lycopersicon esculentum

5

&lt;400&gt; 122

Met Cys Thr Leu Ser Phe Met Tyr Pro Asn Ser Leu Leu Asp Gly Thr  
 1 5 10 15

Cys Lys Thr Val Ala Leu Gly Asp Ser Lys Pro Arg Tyr Asn Lys Gln  
 20 25 30

15

Arg Ser Ser Cys Phe Asp Pro Leu Ile Ile Gly Asn Cys Thr Asp Gln  
 35 40 45

20

Gln Gln Leu Cys Gly Leu Ser Trp Gly Val Asp Lys Ala Lys Gly Arg  
 50 55 60

Arg Gly Gly Thr Val Ser Asn Leu Lys Ala Val Val Asp Val Asp Lys  
 65 70 75 80

Arg Val Glu Ser Tyr Gly Ser Ser Asp Val Glu Gly Asn Glu Ser Gly  
 85 90 95

Ser Tyr Asp Ala Ile Val Ile Gly Ser Gly Ile Gly Gly Leu Val Ala  
 100 105 110

35

Ala Thr Gln Leu Ala Val Lys Gly Ala Lys Val Leu Val Leu Glu Lys  
 115 120 125

40

Tyr Val Ile Pro Gly Gly Ser Ser Gly Phe Tyr Glu Arg Asp Gly Tyr  
 130 135 140

Lys Phe Asp Val Gly Ser Ser Val Met Phe Gly Phe Ser Asp Lys Gly  
 145 150 155 160

Asn Leu Asn Leu Ile Thr Gln Ala Leu Ala Ala Val Gly Arg Lys Leu  
 165 170 175

50

	Glu	Val	Ile	Pro	Asp	Pro	Thr	Thr	Val	His	Phe	His	Leu	Pro	Asn	Asp	
				180					185							190	
5																	
	Leu	Ser	Val	Arg	Ile	His	Arg	Glu	Tyr	Asp	Asp	Phe	Ile	Glu	Glu	Leu	
			195					200					205				
10																	
	Val	Ser	Lys	Phe	Pro	His	Glu	Lys	Glu	Gly	Ile	Ile	Lys	Phe	Tyr	Ser	
			210				215					220					
15																	
	Glu	Cys	Trp	Lys	Ile	Phe	Asn	Ser	Leu	Asn	Ser	Leu	Glu	Leu	Lys	Ser	
	225					230					235					240	
20																	
	Leu	Glu	Glu	Pro	Ile	Tyr	Leu	Phe	Gly	Gln	Phe	Phe	Lys	Lys	Pro	Leu	
					245					250					255		
25																	
	Glu	Cys	Leu	Thr	Leu	Ala	Tyr	Tyr	Leu	Pro	Gln	Asn	Ala	Gly	Ser	Ile	
				260					265					270			
30																	
	Ala	Arg	Lys	Tyr	Ile	Arg	Asp	Pro	Gly	Leu	Leu	Ser	Phe	Ile	Asp	Ala	
			275					280					285				
35																	
	Glu	Cys	Phe	Ile	Val	Ser	Thr	Val	Asn	Ala	Leu	Gln	Thr	Pro	Met	Ile	
			290				295					300					
40																	
	Asn	Ala	Ser	Met	Val	Leu	Cys	Asp	Arg	His	Phe	Gly	Gly	Ile	Asn	Tyr	
	305					310					315					320	
45																	
	Pro	Val	Gly	Gly	Val	Gly	Glu	Ile	Ala	Lys	Ser	Leu	Ala	Lys	Gly	Leu	
					325					330					335		
50																	
	Asp	Asp	His	Gly	Ser	Gln	Ile	Leu	Tyr	Arg	Ala	Asn	Val	Thr	Ser	Ile	
				340					345					350			
55																	
	Ile	Leu	Asp	Asn	Gly	Lys	Ala	Val	Gly	Val	Lys	Leu	Ser	Asp	Gly	Arg	
			355					360					365				

	Lys	Phe	Tyr	Ala	Lys	Thr	Ile	Val	Ser	Asn	Ala	Thr	Arg	Trp	Asp	Thr	
	370						375					380					
5	Phe	Gly	Lys	Leu	Leu	Lys	Ala	Glu	Asn	Leu	Pro	Lys	Glu	Glu	Glu	Asn	
	385					390					395					400	
10	Phe	Gln	Lys	Ala	Tyr	Val	Lys	Ala	Pro	Ser	Phe	Leu	Ser	Ile	His	Met	
				405					410						415		
15	Gly	Val	Lys	Ala	Asp	Val	Leu	Pro	Pro	Asp	Thr	Asp	Cys	His	His	Phe	
				420					425					430			
	Val	Leu	Glu	Asp	Asp	Trp	Thr	Asn	Leu	Glu	Lys	Pro	Tyr	Gly	Ser	Ile	
		435						440						445			
20	Phe	Leu	Ser	Ile	Pro	Thr	Val	Leu	Asp	Ser	Ser	Leu	Ala	Pro	Glu	Gly	
	450						455					460					
25	His	His	Ile	Leu	His	Ile	Phe	Thr	Thr	Ser	Ser	Ile	Glu	Asp	Trp	Glu	
	465					470				475						480	
30	Gly	Leu	Ser	Pro	Lys	Asp	Tyr	Glu	Ala	Lys	Lys	Glu	Val	Val	Ala	Glu	
				485						490					495		
35	Arg	Ile	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu	Lys	Thr	Leu	Phe	Pro	Gly	Leu	Lys	Ser	
				500					505					510			
40	Ser	Ile	Leu	Phe	Lys	Glu	Val	Gly	Thr	Pro	Lys	Thr	His	Arg	Arg	Tyr	
		515						520					525				
45	Lys	Gly	Leu	Leu	Gly	Met	Pro	Phe	Asn	Thr	Thr	Ala	Ile	Asp	Gly	Leu	
	545					550				555						560	
50	Tyr	Cys	Val	Gly	Asp	Ser	Cys	Phe	Pro	Gly	Gln	Gly	Val	Ile	Ala	Val	
				565						570						575	

5

10

15

<211> 1233

<212> DNA

<213> Tagetes erecta

25

**<220>**

<221> CDS

<222> (1) .. (1233)

30

<223>

35

**<400> 123**

atg gcc aca cac aaa ctc ctt caa ttc acc acc aat ctc cca cca tct 48  
Met Ala Thr His Lys Leu Leu Gln Phe Thr Thr Asn Leu Pro Pro Ser  
1 5 10 15

40

tct tct tca atc tct act ggc tgt tca ctc tcc ccc ttc ttc ctc aaa 96  
Ser Ser Ser Ile Ser Thr Gly Cys Ser Leu Ser Pro Phe Phe Leu Lys  
20 25 30

45

tca	tct	tct	cat	tcc	cct	aac	cct	cgc	cga	cac	cgc	cgc	tcc	gcc	gta	144
Ser	Ser	Ser	His	Ser	Pro	Asn	Pro	Arg	Arg	His	Arg	Arg	Ser	Ala	Val	
		35					40					45				

50

tgc	tgc	tct	ttc	gcc	tca	ctc	gac	tct	gca	aaa	atc	aaa	gtc	gtt	ggc	192
Cys	Cys	Ser	Phe	Ala	Ser	Leu	Asp	Ser	Ala	Lys	Ile	Lys	Val	Val	Gly	
50						55					60					

5	gtc ggt ggt ggt ggc aac aat gcc gtt aac cgc atg att ggt agc ggc	240
	Val Gly Gly Gly Gly Asn Asn Ala Val Asn Arg Met Ile Gly Ser Gly	
	65 70 75 80	
	tta cag ggt gtt gat ttt tac gcc att aac acg gac tca caa gcg ctt	288
	Leu Gln Gly Val Asp Phe Tyr Ala Ile Asn Thr Asp Ser Gln Ala Leu	
10	ctg caa tct gtt gca cat aac cct att caa att ggg gag ctt ttg act	336
	Leu Gln Ser Val Ala His Asn Pro Ile Gln Ile Gly Glu Leu Leu Thr	
	100 105 110	
	cgt gga tta ggt act ggt ggg aac ccg ctt ttg gga gaa cag gct gcg	384
	Arg Gly Leu Gly Thr Gly Gly Asn Pro Leu Leu Gly Glu Gln Ala Ala	
15	gag gag tcg aag gaa gcg att ggg aat gcg ctt aaa ggg tcg gat ctt	432
	Glu Glu Ser Lys Glu Ala Ile Gly Asn Ala Leu Lys Gly Ser Asp Leu	
	130 135 140	
	gtg ttt ata aca gca ggt atg ggt ggt ggg acg ggt tcg ggt gct gct	480
	Val Phe Ile Thr Ala Gly Met Gly Gly Gly Thr Gly Ser Gly Ala Ala	
20	cca gtt gta gcg cag ata gcg aaa gaa gca ggg tat tta act gtt ggt	528
	Pro Val Val Ala Gln Ile Ala Lys Glu Ala Gly Tyr Leu Thr Val Gly	
	165 170 175	
	gtt gta acg tac cca ttc agc ttt gaa ggc cgt aaa aga tca gta cag	576
	Val Val Thr Tyr Pro Phe Ser Phe Glu Gly Arg Lys Arg Ser Val Gln	
25	gcg tta gag gct att gag aag ctg caa aag aac gtt gac aca ctt ata	624
	Ala Leu Glu Ala Ile Glu Lys Leu Gln Lys Asn Val Asp Thr Leu Ile	
	195 200 205	
	gtg att cca aat gac cgt ttg ctg gat att gct gat gaa aac acg cct	672
	Val Ile Pro Asn Asp Arg Leu Leu Asp Ile Ala Asp Glu Asn Thr Pro	
30	ctt cag gat gct ttt ctt ctt gct gat gat gta ctc cgc caa gga gtt	720
	Leu Gln Asp Ala Phe Leu Leu Ala Asp Asp Val Leu Arg Gln Gly Val	
	225 230 235 240	
	caa gga atc tca gat ata att aca ata cct ggg ctg gta aat gtg gac	768
	Gln Gly Ile Ser Asp Ile Ile Thr Ile Pro Gly Leu Val Asn Val Asp	
35	ttt gca gac gtt aaa gca gtc atg aaa gat tct gga act gca atg ctt	816

	Phe	Ala	Asp	Val	Lys	Ala	Val	Met	Lys	Asp	Ser	Gly	Thr	Ala	Met	Leu	
				260					265					270			
5	ggt	gtc	ggt	gtt	tcc	tca	agt	aaa	aac	cga	gct	gaa	gaa	gca	gct	gaa	864
	Gly	Val	Gly	Val	Ser	Ser	Ser	Lys	Asn	Arg	Ala	Glu	Glu	Ala	Ala	Glu	
				275				280						285			
10	caa	gca	act	ctt	gct	cct	ttg	att	gga	tca	tca	att	caa	tct	gct	aca	912
	Gln	Ala	Thr	Leu	Ala	Pro	Leu	Ile	Gly	Ser	Ser	Ile	Gln	Ser	Ala	Thr	
				290				295					300				
15	ggt	gtt	gtt	tat	aat	att	acc	gga	ggg	aag	gac	ata	act	cta	caa	gaa	960
	Gly	Val	Val	Tyr	Asn	Ile	Thr	Gly	Gly	Lys	Asp	Ile	Thr	Leu	Gln	Glu	
						310					315					320	
	gtc	aac	agg	gtt	tct	cag	gtg	gta	aca	agt	ttg	gca	gat	cca	tca	gca	1008
	Val	Asn	Arg	Val	Ser	Gln	Val	Val	Thr	Ser	Leu	Ala	Asp	Pro	Ser	Ala	
						325					330				335		
20	aac	att	ata	ttc	ggg	gca	gtg	gta	gat	gag	aga	tac	aac	ggg	gag	att	1056
	Asn	Ile	Ile	Phe	Gly	Ala	Val	Val	Asp	Glu	Arg	Tyr	Asn	Gly	Glu	Ile	
				340					345					350			
25	cat	gtg	acc	att	gtt	gct	act	ggc	ttt	gcc	cag	tcg	ttt	cag	aaa	tct	1104
	His	Val	Thr	Ile	Val	Ala	Thr	Gly	Phe	Ala	Gln	Ser	Phe	Gln	Lys	Ser	
				355				360						365			
30	ctt	ctt	gct	gac	ccg	aaa	gga	gca	aaa	ctt	gtt	gat	aga	aat	caa	gaa	1152
	Leu	Leu	Ala	Asp	Pro	Lys	Gly	Ala	Lys	Leu	Val	Asp	Arg	Asn	Gln	Glu	
				370				375					380				
35	cct	aca	caa	cct	ttg	act	tcc	gcg	aga	tct	ttg	aca	aca	cct	tct	cct	1200
	Pro	Thr	Gln	Pro	Leu	Thr	Ser	Ala	Arg	Ser	Leu	Thr	Thr	Pro	Ser	Pro	
						390					395				400		
	gct	ccg	tct	cgg	tct	agg	aaa	ctc	ttc	ttt	taa						1233
	Ala	Pro	Ser	Arg	Ser	Arg	Lys	Leu	Phe	Phe							
						405				410							
40	<210>			124													
	<211>			410													
45	<212>			PRT													
	<213>			Tagetes erecta													

&lt;400&gt; 124

5 Met Ala Thr His Lys Leu Leu Gln Phe Thr Thr Asn Leu Pro Pro Ser  
 1 5 10 15  
 Ser Ser Ser Ile Ser Thr Gly Cys Ser Leu Ser Pro Phe Phe Leu Lys  
 20 25 30  
 10 Ser Ser Ser His Ser Pro Asn Pro Arg Arg His Arg Arg Ser Ala Val  
 35 40 45  
 15 Cys Cys Ser Phe Ala Ser Leu Asp Ser Ala Lys Ile Lys Val Val Gly  
 50 55 60  
 20 Val Gly Gly Gly Gly Asn Asn Ala Val Asn Arg Met Ile Gly Ser Gly  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Gly Val Asp Phe Tyr Ala Ile Asn Thr Asp Ser Gln Ala Leu  
 85 90 95  
 25 Leu Gln Ser Val Ala His Asn Pro Ile Gln Ile Gly Glu Leu Leu Thr  
 100 105 110  
 30 Arg Gly Leu Gly Thr Gly Gly Asn Pro Leu Leu Gly Glu Gln Ala Ala  
 115 120 125  
 35 Glu Glu Ser Lys Glu Ala Ile Gly Asn Ala Leu Lys Gly Ser Asp Leu  
 130 135 140  
 40 Val Phe Ile Thr Ala Gly Met Gly Gly Gly Thr Gly Ser Gly Ala Ala  
 145 150 155 160  
 Pro Val Val Ala Gln Ile Ala Lys Glu Ala Gly Tyr Leu Thr Val Gly  
 165 170 175  
 45 Val Val Thr Tyr Pro Phe Ser Phe Glu Gly Arg Lys Arg Ser Val Gln  
 180 185 190  
 50

	Ala	Leu	Glu	Ala	Ile	Glu	Lys	Leu	Gln	Lys	Asn	Val	Asp	Thr	Leu	Ile	
	195							200					205				
5	Val	Ile	Pro	Asn	Asp	Arg	Leu	Leu	Asp	Ile	Ala	Asp	Glu	Asn	Thr	Pro	
	210						215					220					
10	Leu	Gln	Asp	Ala	Phe	Leu	Leu	Ala	Asp	Asp	Val	Leu	Arg	Gln	Gly	Val	
	225					230					235					240	
15	Gln	Gly	Ile	Ser	Asp	Ile	Ile	Thr	Ile	Pro	Gly	Leu	Val	Asn	Val	Asp	
					245					250					255		
20	Phe	Ala	Asp	Val	Lys	Ala	Val	Met	Lys	Asp	Ser	Gly	Thr	Ala	Met	Leu	
				260					265					270			
25	Gly	Val	Gly	Val	Ser	Ser	Ser	Lys	Asn	Arg	Ala	Glu	Glu	Ala	Ala	Glu	
				275				280					285				
30	Gln	Ala	Thr	Leu	Ala	Pro	Leu	Ile	Gly	Ser	Ser	Ile	Gln	Ser	Ala	Thr	
	290						295					300					
35	Gly	Val	Val	Tyr	Asn	Ile	Thr	Gly	Gly	Lys	Asp	Ile	Thr	Leu	Gln	Glu	
	305				310					315					320		
40	Val	Asn	Arg	Val	Ser	Gln	Val	Val	Thr	Ser	Leu	Ala	Asp	Pro	Ser	Ala	
					325					330					335		
45	Asn	Ile	Ile	Phe	Gly	Ala	Val	Val	Asp	Glu	Arg	Tyr	Asn	Gly	Glu	Ile	
				340					345					350			
50	His	Val	Thr	Ile	Val	Ala	Thr	Gly	Phe	Ala	Gln	Ser	Phe	Gln	Lys	Ser	
	355							360					365				
55	Leu	Leu	Ala	Asp	Pro	Lys	Gly	Ala	Lys	Leu	Val	Asp	Arg	Asn	Gln	Glu	
	370						375					380					
60	Pro	Thr	Gln	Pro	Leu	Thr	Ser	Ala	Arg	Ser	Leu	Thr	Thr	Pro	Ser	Pro	
	385					390					395					400	



Ala Pro Ser Arg Ser Arg Lys Leu Phe Phe  
 405 410

5

<210> 125

<211> 891

10

<212> DNA

<213> Tagetes erecta

15

<220>

<221> CDS

20

<222> (1) .. (891)

<223>

25

<400> 125

atg aca tcc ctg agg ttt cta aca gaa ccc tca ctt gta tgc tca tcc 48

Met Thr Ser Leu Arg Phe Leu Thr Glu Pro Ser Leu Val Cys Ser Ser

30

1 5 10 15

act ttc ccc aca ttc aat ccc cta cac aaa acc cta act aaa cca aca 96

Thr Phe Pro Thr Phe Asn Pro Leu His Lys Thr Leu Thr Lys Pro Thr

20

25

30

35

cca aaa ccc tac cca aag cca cca cca att cgc tcc gtc ctt caa tac 144

Pro Lys Pro Tyr Pro Lys Pro Pro Pro Ile Arg Ser Val Leu Gln Tyr

35

40

45

40

aat cgc aaa cca gag ctc gcc gga gac act cca cga gtc gtc gca atc 192

Asn Arg Lys Pro Glu Leu Ala Gly Asp Thr Pro Arg Val Val Ala Ile

50

55

60

45

gac gcc gac gtt ggt cta cgt aac ctc gat ctt ctt ctc ggt ctc gaa 240

Asp Ala Asp Val Gly Leu Arg Asn Leu Asp Leu Leu Leu Gly Leu Glu

65

70

75

80

50

aac cgc gtc aat tac acc gtc gtt gaa gtt ctc aac ggc gat tgc aga 288

Asn Arg Val Asn Tyr Thr Val Val Glu Val Leu Asn Gly Asp Cys Arg

85

90

95

	ctc gac caa gcc cta gtt cgt gat aaa cgc tgg tca aat ttc gaa ttg	336
	Leu Asp Gln Ala Leu Val Arg Asp Lys Arg Trp Ser Asn Phe Glu Leu	
	100 105 110	
5	ctt tgt att tca aaa cct agg tca aaa ttg cct tta gga ttt ggg gga	384
	Leu Cys Ile Ser Lys Pro Arg Ser Lys Leu Pro Leu Gly Phe Gly Gly	
	115 120 125	
10	aaa gct tta gtt tgg ctt gat gca tta aaa gat agg caa gaa ggt tgc	432
	Lys Ala Leu Val Trp Leu Asp Ala Leu Lys Asp Arg Gln Glu Gly Cys	
	130 135 140	
15	ccg gat ttt ata ctt ata gat tgt cct gca ggt att gat gcc ggg ttc	480
	Pro Asp Phe Ile Leu Ile Asp Cys Pro Ala Gly Ile Asp Ala Gly Phe	
	145 150 155 160	
20	ata acc gcc att aca ccg gct aac gaa gcc gta tta gtt aca aca cct	528
	Ile Thr Ala Ile Thr Pro Ala Asn Glu Ala Val Leu Val Thr Thr Pro	
	165 170 175	
25	gat att act gca ttg aga gat gca gat aga gtt aca ggc ttg ctt gaa	576
	Asp Ile Thr Ala Leu Arg Asp Ala Asp Arg Val Thr Gly Leu Leu Glu	
	180 185 190	
30	tgt gat gga att agg gat att aaa atg att gtg aac aga gtt aga act	624
	Cys Asp Gly Ile Arg Asp Ile Lys Met Ile Val Asn Arg Val Arg Thr	
	195 200 205	
35	gat ttg ata agg ggt gaa gat atg atg tca gtt ctt gat gtt caa gag	672
	Asp Leu Ile Arg Gly Glu Asp Met Met Ser Val Leu Asp Val Gln Glu	
	210 215 220	
40	atg ttg gga ttg tca ttg ttg agt gat acc cga gga ttc gaa gtg att	720
	Met Leu Gly Leu Ser Leu Leu Ser Asp Thr Arg Gly Phe Glu Val Ile	
	225 230 235 240	
45	cgg agt acg aat aga ggg ttt ccg ctt gtg ttg aac aag cct ccg act	768
	Arg Ser Thr Asn Arg Gly Phe Pro Leu Val Leu Asn Lys Pro Pro Thr	
	245 250 255	
50	tta gca gga ttg gca ttt gag cag gct gct tgg aga ttg gtt gag caa	816
	Leu Ala Gly Leu Ala Phe Glu Gln Ala Ala Trp Arg Leu Val Glu Gln	
	260 265 270	
55	gat agc atg aag gct gtg atg gtg gag gaa gaa cct aaa aag agg gga	864
	Asp Ser Met Lys Ala Val Met Val Glu Glu Glu Pro Lys Lys Arg Gly	
	275 280 285	
60	ttt ttc tcg ttt ttt gga ggt tag tga	891

Phe Phe Ser Phe Phe Gly Gly  
290 295

5 <210> 126

<211> 295

<212> PRT

10

<213> Tagetes erecta

15 <400> 126

Met Thr Ser Leu Arg Phe Leu Thr Glu Pro Ser Leu Val Cys Ser Ser  
1 5 10 15

20

Thr Phe Pro Thr Phe Asn Pro Leu His Lys Thr Leu Thr Lys Pro Thr  
20 25 30

25

Pro Lys Pro Tyr Pro Lys Pro Pro Pro Ile Arg Ser Val Leu Gln Tyr  
35 40 45

30

Asn Arg Lys Pro Glu Leu Ala Gly Asp Thr Pro Arg Val Val Ala Ile  
50 55 60

Asp Ala Asp Val Gly Leu Arg Asn Leu Asp Leu Leu Leu Gly Leu Glu  
65 70 75 80

35

Asn Arg Val Asn Tyr Thr Val Val Glu Val Leu Asn Gly Asp Cys Arg  
85 90 95

40

Leu Asp Gln Ala Leu Val Arg Asp Lys Arg Trp Ser Asn Phe Glu Leu  
100 105 110

45

Leu Cys Ile Ser Lys Pro Arg Ser Lys Leu Pro Leu Gly Phe Gly Gly  
115 120 125

50

Lys Ala Leu Val Trp Leu Asp Ala Leu Lys Asp Arg Gln Glu Gly Cys  
130 135 140

5 Pro Asp Phe Ile Leu Ile Asp Cys Pro Ala Gly Ile Asp Ala Gly Phe  
 145 150 155 160

Ile Thr Ala Ile Thr Pro Ala Asn Glu Ala Val Leu Val Thr Thr Pro  
 165 170 175

10 Asp Ile Thr Ala Leu Arg Asp Ala Asp Arg Val Thr Gly Leu Leu Glu  
 180 185 190

15 Cys Asp Gly Ile Arg Asp Ile Lys Met Ile Val Asn Arg Val Arg Thr  
 195 200 205

20 Asp Leu Ile Arg Gly Glu Asp Met Met Ser Val Leu Asp Val Gln Glu  
 210 215 220

25 Met Leu Gly Leu Ser Leu Leu Ser Asp Thr Arg Gly Phe Glu Val Ile  
 225 230 235 240

Arg Ser Thr Asn Arg Gly Phe Pro Leu Val Leu Asn Lys Pro Pro Thr  
 245 250 255

30 Leu Ala Gly Leu Ala Phe Glu Gln Ala Ala Trp Arg Leu Val Glu Gln  
 260 265 270

35 Asp Ser Met Lys Ala Val Met Val Glu Glu Glu Pro Lys Lys Arg Gly  
 275 280 285

40 Phe Phe Ser Phe Phe Gly Gly  
 290 295

<210> 127

45 <211> 332 -

<212> DNA

<213> Tagetes erecta

50

&lt;220&gt;

5 &lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1) .. (330)

&lt;223&gt;

10

&lt;400&gt; 127

15 aag ctt gca cga gcc tct ctc tat ttt tac act tca atg gcg gca gca 48  
 Lys Leu Ala Arg Ala Ser Leu Tyr Phe Tyr Thr Ser Met Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

20 att gct gtc cct tgt agc tca aga cca ttt ggc tta ggt cga atg cgg 96  
 Ile Ala Val Pro Cys Ser Ser Arg Pro Phe Gly Leu Gly Arg Met Arg  
 20 25 30

25 tta ctt ggt cat aaa ccc aca acc ata act tgt cac ttc ccc ttt tct 144  
 Leu Leu Gly His Lys Pro Thr Thr Ile Thr Cys His Phe Pro Phe Ser  
 35 40 45

ttt tct atc aaa tca ttt acc cca att gtt agg ggc aga aga tgt act 192  
 Phe Ser Ile Lys Ser Phe Thr Pro Ile Val Arg Gly Arg Arg Cys Thr  
 50 55 60

30 gtt tgt ttt gtt gcc ggt ggc gac agt aat agt aac agt aat aat aat 240  
 Val Cys Phe Val Ala Gly Gly Asp Ser Asn Ser Asn Ser Asn Asn Asn  
 65 70 75 80

35 agt gac agt aat agt aat aat ccg ggt ctg gat tta aac ccg gcg gtt 288  
 Ser Asp Ser Asn Ser Asn Asn Pro Gly Leu Asp Leu Asn Pro Ala Val  
 85 90 95

40 atg aac cgt aac cgt ttg gtt gaa gaa aaa atg gag agg tcg ac 332  
 Met Asn Arg Asn Arg Leu Val Glu Glu Lys Met Glu Arg Ser  
 100 105 110

&lt;210&gt; 128

45 &lt;211&gt; 110

&lt;212&gt; PRT

50 <213> Tagetes erecta

&lt;400&gt; 128

5 Lys Leu Ala Arg Ala Ser Leu Tyr Phe Tyr Thr Ser Met Ala Ala Ala  
1 5 10 15

10 Ile Ala Val Pro Cys Ser Ser Arg Pro Phe Gly Leu Gly Arg Met Arg  
20 25 30

15 Leu Leu Gly His Lys Pro Thr Thr Ile Thr Cys His Phe Pro Phe Ser  
35 40 45

20 Phe Ser Ile Lys Ser Phe Thr Pro Ile Val Arg Gly Arg Arg Cys Thr  
50 55 60

25 Val Cys Phe Val Ala Gly Gly Asp Ser Asn Ser Asn Ser Asn Asn Asn  
65 70 75 80

30 Ser Asp Ser Asn Ser Asn Asn Pro Gly Leu Asp Leu Asn Pro Ala Val  
85 90 95

35 Met Asn Arg Asn Arg Leu Val Glu Glu Lys Met Glu Arg Ser  
100 105 110

&lt;210&gt; 129

35 &lt;211&gt; 37

&lt;212&gt; DNA

40 <213> Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

45 &lt;221&gt; Primer

&lt;222&gt; (1) .. (37)

&lt;223&gt;

50

5 <400> 129  
gcgcgatgcat ctagaaatga tccagttaga acaacca 37

10 <210> 130  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

15 ● <220>  
<221> Primer  
20 <222> (1)..(37)  
<223>

25 <400> 130  
gcgcgatgctc tagactatgtt tgctttgtaa atttctg 37

30 <210> 131  
<211> 792  
● 35 <212> DNA  
<213> Nostoc punctiforme ATCC 29133

40 <220>  
<221> CDS  
45 <222> (5)..(775)  
<223>

50

&lt;400&gt; 131

	gcgc atg cat cta gaa atg atc cag tta gaa caa cca ctc agt cat caa	49
	Met His Leu Glu Met Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln	
	1 5 10 15	
5		
	gca aaa ctg act cca gta ctg aga agt aaa tct cag ttt aag ggg ctt	97
	Ala Lys Leu Thr Pro Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu	
	20 25 30	
10		
	ttc att gct att gtc att gtt agc gca tgg gtc att agc ctg agt tta	145
	Phe Ile Ala Ile Val Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu	
	35 40 45	
15		
	tta ctt tcc ctt gac atc tca aag cta aaa ttt tgg atg tta ttg cct	193
	Leu Leu Ser Leu Asp Ile Ser Lys Leu Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro	
	50 55 60	
20		
	gtt ata cta tgg caa aca ttt tta tat acg gga tta ttt att aca tct	241
	Val Ile Leu Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser	
	65 70 75	
25		
	cat gat gcc atg cat ggc gta gta ttt ccc caa aac acc aag att aat	289
	His Asp Ala Met His Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn	
	80 85 90 95	
30		
	cat ttg att gga aca ttg acc cta tcc ctt tat ggt ctt tta cca tat	337
	His Leu Ile Gly Thr Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr	
	100 105 110	
35		
	caa aaa cta ttg aaa aaa cat tgg tta cac cac cac aat cca gca agc	385
	Gln Lys Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His His Asn Pro Ala Ser	
	115 120 125	
40		
	tca ata gac ccg gat ttt cac aat ggt aaa cac caa agt ttc ttt gct	433
	Ser Ile Asp Pro Asp Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala	
	130 135 140	
45		
	tgg tat ttt cat ttt atg aaa ggt tac tgg agt tgg ggg caa ata att	481
	Trp Tyr Phe His Phe Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile	
	145 150 155	
50		
	gcg ttg act att att tat aac ttt gct aaa tac ata ctc cat atc cca	529
	Ala Leu Thr Ile Ile Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro	
	160 165 170 175	
55		
	agt gat aat cta act tac ttt tgg gtg cta ccc tcg ctt tta agt tca	577
	Ser Asp Asn Leu Thr Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser	
	180 185 190	
60		
	tta caa tta ttc tat ttt ggt act ttt tta ccc cat agt gaa cca ata	625



## 208

	Leu	Gln	Leu	Phe	Tyr	Phe	Gly	Thr	Phe	Leu	Pro	His	Ser	Glu	Pro	Ile	
				195					200					205			
5	ggg	ggt	tat	ggt	cag	cct	cat	tgt	gcc	caa	aca	att	agc	cgt	cct	att	673
	Gly	Gly	Tyr	Val	Gln	Pro	His	Cys	Ala	Gln	Thr	Ile	Ser	Arg	Pro	Ile	
				210				215					220				
10	tgg	tgg	tca	ttt	atc	acg	tgc	tat	cat	ttt	ggc	tac	cac	gag	gaa	cat	721
	Trp	Trp	Ser	Phe	Ile	Thr	Cys	Tyr	His	Phe	Gly	Tyr	His	Glu	Glu	His	
				225			230				235						
15	cac	gaa	tat	cct	cat	att	tct	tgg	tgg	cag	tta	cca	gaa	att	tac	aaa	769
	His	Glu	Tyr	Pro	His	Ile	Ser	Trp	Trp	Gln	Leu	Pro	Glu	Ile	Tyr	Lys	
				240			245				250				255		
	gca	aaa	tagtctagag	catgcgc													792
	Ala	Lys															
20																	
	<210>			132													
	<211>			257													
25	<212>			PRT													
	<213>			Nostoc punctiforme ATCC 29133													
30																	
	<400>			132													
35	Met	His	Leu	Glu	Met	Ile	Gln	Leu	Glu	Gln	Pro	Leu	Ser	His	Gln	Ala	
	1				5					10					15		
	Lys	Leu	Thr	Pro	Val	Leu	Arg	Ser	Lys	Ser	Gln	Phe	Lys	Gly	Leu	Phe	
				20					25					30			
40																	
	Ile	Ala	Ile	Val	Ile	Val	Ser	Ala	Trp	Val	Ile	Ser	Leu	Ser	Leu	Leu	
				35				40					45				
45																	
	Leu	Ser	Leu	Asp	Ile	Ser	Lys	Leu	Lys	Phe	Trp	Met	Leu	Leu	Pro	Val	
				50			55					60					
50																	
	Ile	Leu	Trp	Gln	Thr	Phe	Leu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Phe	Ile	Thr	Ser	His	
	65					70				75					80		

50

<210> 133

<211> 26

5 <212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

10

<220>

<221> Primer

15 <222> (1) .. (26)

● <223>

20

<400> 133

gtcgaccctg ctttaatgag atatgc

26

25 <210> 134

<211> 27

<212> DNA

30

<213> Künstliche Sequenz

35

● <220>

<221> Primer

<222> (1) .. (27)

40

<223>

45

<400> 134

ctcgagcttg gacaatcagt aaattga

27

50

<210> 135

<211> 210

<212> DNA

5 <213> Agrobacterium tumefaciens

<220>

10

<221> Terminator

<222> (1) .. (210)

15

<223>

<400> 135

20 gtcgaccctg ctttaatgag atatgcgaga cgcctatgat cgcgatgatat ttgctttcaa 60

ttctgttgtg cacgttgtaa aaaacctgag catgtgtagc tcagatcett accgccggtt 120

25 tcggttcatt ctaatgaata tatcaccctg tactatcgta tttttatgaa taatattctc 180

cgttcaattt actgattgtc caagctcgag 210

<210> 136

30

<211> 37

<212> DNA

35

<213> Künstliche Sequenz

<220>

40

<221> Primer

<222> (1) .. (37)

45

<223>

<400> 136

50 cccgggaatt cttcattatt tcgattttga ttctgtg 37

<210> 137

5 <211> 38

<212> DNA

10 <213> Künstliche Sequenz

<220>

15 <221> Primer

● <222> (1) .. (38)

20 <223>

<400> 137

25 aagcttggtt gatcagaaga agaagaagaa gatgaact

38

<210> 138

<211> 652

30 <212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

● 35

<220>

<221> Promotor

40 <222> (1) .. (652)

<223>

45

<400> 138

cccgggaatt cttcattatt tcgattttga tttcgtgacc agcgaacgca gaataccttg 60

50 ttgtgtaata ctttaccgt gtaaataaaa aacaaaaagg cttttgagct ttttgtagtt 120

gaatttctct ggctgatctt ttctgtacag attcatatat ctgcagagac gatattcattg 180  
 attatttgag cttcttttga actatttcgt gtaatttggg atgagagctc tatgtatgtg 240  
 5 tgtaaacttt gaagacaaca agaaaggtaa caagtgaggg agggatgact ccatgtcaaa 300  
 atagatgtca taagaggccc atcaataagt gottgagccc attagctagc ccagtaacta 360  
 10 ccagattgtg agatggatgt gtgaacagtt ttttttttga tgtaggactg aaatgtgaac 420  
 aacaggcgca tgaaaggcta aattaggaca atgataagca gaaataactt atcctctcta 480  
 15 acacttggcc tcacattgcc cttcacacaa tccacacaca tccaatcaca acctcatcat 540  
 atatctcccg ctaatctttt tttctttgat cttttttttt ttgcttatta tttttttgac 600  
 tttgatctcc catcagttca tcttcttctt cttcttctga tcaaccaage tt 652  
 20  
 <210> 139  
 <211> 29  
 25 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
 30  
 <220>  
 <221> Primer  
 35 <222> (1) .. (29)  
 <223>  
 40  
 <400> 139  
 gagctctagc gcaatcttat gtggtacaa 29  
 45 <210> 140  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 50

<213> Künstliche Sequenz

5 <220>

<221> Primer

<222> (1) .. (29)

10

<223>

15

<400> 140

aagcttttct tgaaagtaaa gattgagtc

29

<210> 141

20

<211> 1773

<212> DNA

25

<213> Petunia hybrida

<220>

30

<221> Promotor

<222> (1) .. (1773)

35

<223>

<400> 141

40

gagctctagc gcaatcttat gtggtacaaa tcttgattag tcgggaaaaa atgatgtggc 60

cctacaaatg gttggaggat gggagatttg gctctatcta gagttatgtg gttggtgaag 120

catttggtta ctctctgctg tggtagttgg catatccaca ttgtctcctt ccacttttat 180

45

gacaattacg tgaaagttat gggttgtttt gtctattttt gtcgaggcct ttcttttctt 240

tccaggttgt tgaagatggg ccaattcgat tagaataatg ttttgagctt tagcatattc 300

50

tctctogttt acacgattat agtaataatg atataggatg acagaagttg acacataaat 360

	tttttattct ctccatttac tttaatccaa atctcaccta ccctaaactt ctttaatatg	420
5	tattcaatag tctatccgag taaattgtaa atttaacaac cattgataat attgacacct	480
	actaacatat actagtaaag agaattattaa catggcacat ataatttgat gcaaaatgag	540
	tatgatgaaa tttaaaccba aaatctcttg attttgacag tgtcaccttg acttggtaac	600
10	taataagtca tgttttagtg gcagaaagac aaactcatcc accaactgta tagcaataaa	660
	aatagaaga atcttcctga ggcaaagttt tggaaaaatt aagagtggct gagatttaat	720
15	ttcaacagga attagttcca cttaactttt aggttacgat acagtgctaa ttaaataact	780
	taattgtatt agatatttct tgcacctaaa aaatttaaaa actgaaaaaa ggtagcaatc	840
	aaaataaaca aaaggacaaa ataagtgaag ggtacagcca ccaaccctgg cggctcactg	900
20	tttgttgggtt aaaacgtaga cttacaccta ccaaaatcta caactaaaat gaggcaataa	960
	tactttgccc aaaattacca agaaaagaaa aagaaaggaa tcccttaata ttactctcct	1020
25	ccatttcaca ataaatatcc tagtttgact taaattagag tttaaaaaat gaaagacgac	1080
	ttttaaaact tgtaatctaa aataaatcat agttaaatgt gtggctataa atcattgtat	1140
	taacggtaaa gtggtaagtt taaaagttaa ttgttttcaa atataaaaatt gtactatcat	1200
30	tctttttgga atggactaat aagaaaacta tgacatccat tatggagcgg agggagtatc	1260
	tccttttaac aataaccttt gtcccttcaa ttcaattatc agtatgcaaa cattaaaaat	1320
35	tattattgat gttaagtacc acatcatcct taatgataga atcatcgtag aacgcttttc	1380
	caggcacaca ttcaaactag ttagaccagt accacacatc gaatattcca gacttctttg	1440
	tttgaatagt cgactacatt ggataatgga acttctcgaa ttaacttcga attagtcgag	1500
40	cccaaaataa tatatacgtc ggggtgaaaa ctataaaatg tttgacaaaa atgtcaaatt	1560
	aatatatcaa tctgcaacaa ctttttcacc ttgagaacac agctgaaatt ttttaciaag	1620
45	gtagttggtg aagctagtca gcgaatccca ttacottcca ctctacctaa ccccttcac	1680
	caacaacaaa tttctgtaat ttaaaaacta gccaaaaaag aactctcttt taciaagagc	1740
	caaagactca atctttactt tcaagaaaag ctt	1773



<210> 142

<211> 39

5 <212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

10

<220>

<221> Primer

15 <222> (1) .. (39)

<223>

20

<400> 142

gcgcacatgcac ctagaaatga attttttgtga taaaccagt

39

25

<210> 143

<211> 37

<212> DNA

30

<213> Künstliche Sequenz

35

<220>

<221> Primer

<222> (1) .. (37)

40

<223>

45

<400> 143

gcgcacatgctc tagattacga attgggttact gaattgt

37

50

<210> 144

&lt;211&gt; 819

&lt;212&gt; DNA

5 &lt;213&gt; Nostoc punctiforme ATCC 29133

&lt;220&gt;

10

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (5)..(802)

15 &lt;223&gt;

&lt;400&gt; 144

20 gcgc atg cat cta gaa atg aat ttt tgt gat aaa cca gtt agc tat tat 49  
 Met His Leu Glu Met Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr  
 1 5 10 15

25 gtt gca ata gag caa tta agt gct aaa gaa gat act gtt tgg ggg ctg 97  
 Val Ala Ile Glu Gln Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu  
 20 25 30

30 gtg att gtc ata gta att att agt ctt tgg gta gct agt ttg gct ttt 145  
 Val Ile Val Ile Val Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe  
 35 40 45

35 tta cta gct att aat tat gcc aaa gtc cca att tgg ttg ata cct att 193  
 Leu Leu Ala Ile Asn Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile  
 50 55 60

gca ata gtt tgg caa atg ttc ctt tat aca ggg cta ttt att act gca 241  
 Ala Ile Val Trp Gln Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala  
 65 70 75

40 cat gat gct atg cat ggg tca gtt tat cgt aaa aat ccc aaa att aat 289  
 His Asp Ala Met His Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn  
 80 85 90 95

45 aat ttt atc ggt tca cta gct gta gcg ctt tac gct gtg ttt cca tat 337  
 Asn Phe Ile Gly Ser Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr  
 100 105 110

50 caa cag atg tta aag aat cat tgc tta cat cat cgt cat cct gct agc 385  
 Gln Gln Met Leu Lys Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser  
 115 120 125

5      gaa gtt gac cca gat ttt cat gat ggt aag aga aca aac gct att ttc      433  
       Glu Val Asp Pro Asp Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe  
               130                        135                        140

10     tgg tat ctc cat ttc atg ata gaa tac tcc agt tgg caa cag tta ata      481  
       Trp Tyr Leu His Phe Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile  
               145                        150                        155

15     gta cta act atc cta ttt aat tta gct aaa tac gtt ttg cac atc cat      529  
       Val Leu Thr Ile Leu Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His  
               160                        165                        170                        175

20     caa ata aat ctc atc tta ttt tgg agt att cct cca att tta agt tcc      577  
       Gln Ile Asn Leu Ile Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser  
                               180                        185                        190

25     att caa ctg ttt tat ttc gga aca ttt ttg cct cat cga gaa ccc aag      625  
       Ile Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys  
                               195                        200                        205

30     aaa gga tat gtt tat ccc cat tgc agc caa aca ata aaa ttg cca act      673  
       Lys Gly Tyr Val Tyr Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr  
                               210                        215                        220

35     ttt ttg tca ttt atc gct tgc tac cac ttt ggt tat cat gaa gaa cat      721  
       Phe Leu Ser Phe Ile Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His  
                               225                        230                        235

40     cat gag tat ccc cat gta cct tgg tgg caa ctt cca tct gta tat aag      769  
       His Glu Tyr Pro His Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys  
                               240                        245                        250                        255

45     cag aga gta ttc aac aat tca gta acc aat tcg taatctagag catgcgc      819  
       Gln Arg Val Phe Asn Asn Ser Val Thr Asn Ser  
                               260                        265

50     <210> 145  
       <211> 266  
       <212> PRT  
       <213> Nostoc punctiforme ATCC 29133  
       <400> 145

## 219

Met	His	Leu	Glu	Met	Asn	Phe	Cys	Asp	Lys	Pro	Val	Ser	Tyr	Tyr	Val	
1				5					10					15		
5	Ala	Ile	Glu	Gln	Leu	Ser	Ala	Lys	Glu	Asp	Thr	Val	Trp	Gly	Leu	Val
				20					25					30		
10	Ile	Val	Ile	Val	Ile	Ile	Ser	Leu	Trp	Val	Ala	Ser	Leu	Ala	Phe	Leu
		35						40					45			
15	Leu	Ala	Ile	Asn	Tyr	Ala	Lys	Val	Pro	Ile	Trp	Leu	Ile	Pro	Ile	Ala
		50					55					60				
20	Ile	Val	Trp	Gln	Met	Phe	Leu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Phe	Ile	Thr	Ala	His
	65					70					75				80	
25	Asp	Ala	Met	His	Gly	Ser	Val	Tyr	Arg	Lys	Asn	Pro	Lys	Ile	Asn	Asn
					85					90				95		
30	Phe	Ile	Gly	Ser	Leu	Ala	Val	Ala	Leu	Tyr	Ala	Val	Phe	Pro	Tyr	Gln
			100						105					110		
35	Gln	Met	Leu	Lys	Asn	His	Cys	Leu	His	His	Arg	His	Pro	Ala	Ser	Glu
		115						120					125			
40	Val	Asp	Pro	Asp	Phe	His	Asp	Gly	Lys	Arg	Thr	Asn	Ala	Ile	Phe	Trp
		130						135					140			
45	Tyr	Leu	His	Phe	Met	Ile	Glu	Tyr	Ser	Ser	Trp	Gln	Gln	Leu	Ile	Val
	145					150					155				160	
50	Leu	Thr	Ile	Leu	Phe	Asn	Leu	Ala	Lys	Tyr	Val	Leu	His	Ile	His	Gln
					165					170				175		
55	Ile	Asn	Leu	Ile	Leu	Phe	Trp	Ser	Ile	Pro	Pro	Ile	Leu	Ser	Ser	Ile
					180				185				190			
60	Gln	Leu	Phe	Tyr	Phe	Gly	Thr	Phe	Leu	Pro	His	Arg	Glu	Pro	Lys	Lys
			195					200					205			

Gly Tyr Val Tyr Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe  
 210 215 220

5

Leu Ser Phe Ile Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His  
 225 230 235 240

10

Glu Tyr Pro His Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln  
 245 250 255

15

Arg Val Phe Asn Asn Ser Val Thr Asn Ser  
 260 265

20

<210> 146

<211> 33

<212> DNA

25

<213> Künstliche Sequenz

30

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(33)

35

<223>

40

<400> 146  
 gcgcgatgcat ctagaaatgg cgatcgccat tat

33

45

<210> 147

<211> 32

<212> DNA

50

<213> Künstliche Sequenz

<220>

5 <221> Primer

<222> (1)..(32)

<223>

10

<400> 147  
gcgc atg cat cta gaa atg gcg atc gcc att att agt ata tgg gct atc 32  
15

<210> 148

<211> 720

20 <212> DNA

<213> Nodularia spumigena NSOR10

25

<220>

<221> CDS

30 <222> (5)..(703)

<223>

35

<400> 148  
gcgc atg cat cta gaa atg gcg atc gcc att att agt ata tgg gct atc 49  
Met His Leu Glu Met Ala Ile Ala Ile Ile Ser Ile Trp Ala Ile  
40 1 5 10 15

agc cta ggt ttg tta ctt tat att gat ata tcc caa ttc aag ttt tgg 97  
Ser Leu Gly Leu Leu Leu Tyr Ile Asp Ile Ser Gln Phe Lys Phe Trp  
20 25 30

45 atg ttg tta ccg ctc ata ttt tgg caa aca ttt tta tat acg gga tta 145  
Met Leu Leu Pro Leu Ile Phe Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu  
35 40 45

50 ttt att aca gct cat gat gcc atg cat ggg gta gtt ttt ccc aaa aat 193

## 222

Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His Gly Val Val Phe Pro Lys Asn  
50 55 60

[illegible]

ctt tta cct tat caa aaa ctt tta aaa aag cat tgg cta cat cac cat 289  
 Leu Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His His  
 10 80 85 90 95

aat cca gcc agt gaa aca gat cca gat ttt cac aac ggg aag cag aaa 337  
Asn Pro Ala Ser Glu Thr Asp Pro Asp Phe His Asn Gly Lys Gln Lys  
100 105 110

aac ttt ttt gct tgg tat tta tat ttt atg aag cgt tac tgg agt tgg 385  
Asn Phe Phe Ala Trp Tyr Leu Tyr Phe Met Lys Arg Tyr Trp Ser Trp  
115 120 125

20    tta caa att atc aca tta atg att att tat aac tta cta aaa tat ata                    433  
       Leu Gln Ile Ile Thr Leu Met Ile Ile Tyr Asn Leu Leu Lys Tyr Ile  
               130                    135                    140

25      tgg cat ttt cca gag gat aat atg act tat ttt tgg gta gtt ccc tca            481  
     Trp His Phe Pro Glu Asp Asn Met Thr Tyr Phe Trp Val Val Pro Ser  
           145                          150                          155

att tta agt tct tta caa tta ttt tat ttt gga act ttt cta ccc cac 529  
Ile Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His  
30 160 165 170 175

```

      agt gag cct gta gaa ggt tat aaa gag cct cat cgt tcc caa act att      577
      Ser Glu Pro Val Glu Gly Tyr Lys Glu Pro His Arg Ser Gln Thr Ile
              180                      185                      190

```

agc cgt ccc att tgg tgg tca ttt ata act tgt tac cat ttt ggt tat 625  
 Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr  
 195 200 205

40 cat tac gaa cat cat gaa tac ccc cat gtt cct tgg tgg caa tta cca 673  
His Tyr Glu His His Glu Tyr Pro His Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro  
210 215 220

45      gaa att tat aaa atg tct aaa tca aat ttg tgatctagag catgcgc      720  
       Glu Ile Tyr Lys Met Ser Lys Ser Asn Leu  
           225                                230

<210> 149

&lt;211&gt; 233

&lt;212&gt; PRT

5 &lt;213&gt; Nodularia spumigena NSOR10

&lt;400&gt; 149

10

Met His Leu Glu Met Ala Ile Ala Ile Ile Ser Ile Trp Ala Ile Ser  
 1 5 10 15

15

Leu Gly Leu Leu Leu Tyr Ile Asp Ile Ser Gln Phe Lys Phe Trp Met  
 20 25 30

20

Leu Leu Pro Leu Ile Phe Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe  
 35 40 45

25

Ile Thr Ala His Asp Ala Met His Gly Val Val Phe Pro Lys Asn Pro  
 50 55 60

Lys Ile Asn His Phe Ile Gly Ser Leu Cys Leu Phe Leu Tyr Gly Leu  
 65 70 75 80

30

Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His His Asn  
 85 90 95

35

Pro Ala Ser Glu Thr Asp Pro Asp Phe His Asn Gly Lys Gln Lys Asn  
 100 105 110

40

Phe Phe Ala Trp Tyr Leu Tyr Phe Met Lys Arg Tyr Trp Ser Trp Leu  
 115 120 125

45

Gln Ile Ile Thr Leu Met Ile Ile Tyr Asn Leu Leu Lys Tyr Ile Trp  
 130 135 140

His Phe Pro Glu Asp Asn Met Thr Tyr Phe Trp Val Val Pro Ser Ile  
 145 150 155 160

50



224

Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser  
 165 170 175

5 Glu Pro Val Glu Gly Tyr Lys Glu Pro His Arg Ser Gln Thr Ile Ser  
 180 185 190

10 Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His  
 195 200 205

15 Tyr Glu His His Glu Tyr Pro His Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Glu  
 210 215 220

Ile Tyr Lys Met Ser Lys Ser Asn Leu  
 225 230

20 <210> 150

<211> 24

25 <212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

30 <220>

<221> Primer

35 <222> (1) .. (24)

<223>

40 <400> 150  
 gaattcctgc aatagaatgt tgag

24

45 <210> 151

<211> 25

<212> DNA

50

<213> Künstliche Sequenz

5 <220>

<221> Primer

<222> (1)..(25)

10

<223>

15 <400> 151  
ctcgagctta cgagcatttt ctaag

25

20 <210> 152

<211> 25

<212> DNA

25 <213> Künstliche Sequenz

30 <220>

<221> Primer

<222> (1)..(25)

35 <223>

40 <400> 152  
gaattcccaa taataatcta cagcc

25

<210> 153

45 <211> 25

<212> DNA

50 <213> Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

5 &lt;221&gt; Primer

&lt;222&gt; (1)..(25)

&lt;223&gt;

10

&lt;400&gt; 153

aagcttgcaac gagcctctct ctatt

15

25

&lt;210&gt; 154

&lt;211&gt; 25

20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

25

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Primer

30

&lt;222&gt; (1)..(25)

&lt;223&gt;

35

&lt;400&gt; 154

gtcgacctct ccattttttc ttcaa

25

40

&lt;210&gt; 155

&lt;211&gt; 22

45

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

50

<220>

<221> Primer

5 <222> (1) .. (22)

<223>

10

<400> 155  
gaattcggca cgagcctctc tc

22

15

<210> 156

<211> 23

<212> DNA

20

<213> Künstliche Sequenz

25

<220>

<221> Primer

<222> (1) .. (23)

30

<223>

35

<400> 156  
ggatcctctc cattttttct tca

23

40

<210> 157

<211> 24

<212> DNA

45

<213> Künstliche Sequenz

50

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(24)

5 <223>

10 <400> 157  
gagctctagc gcaatcttat gtgg

24

<210> 158

15 <211> 22

<212> DNA

20 <213> Künstliche Sequenz

<220>

25 <221> Primer

<222> (1)..(22)

30 <223>

35 <400> 158  
ccatggttct cacttctgta tg

22

<210> 159

40 <211> 25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

45

<220>

50 <221> Primer

<222> (1) .. (25)

<223>

5

<400> 159  
aagcttccat ggcggccgga atttc

25

10

<210> 160

<211> 307

15

<212> DNA

<213> Vicia faba

20

<220>

<221> Terminator

25

<222> (1) .. (307)

<223>

30

<400> 160  
gaattcctgc aatagaatgt tgagggtgacc actttctgta ataaaataat tataaaataa 60

atttagaatt gctgtagtca agaacatcag ttctaaaata ttaataaagt tatggccttt 120

tgacatatgt gtttcgataa aaaaatcaaa ataaattgag atttattcga aatacaatga 180

aagtttgcag atatgagata tgtttctaca aaataataac ttaaaactca actatatgct 240

aatgttttttc ttggtgtggt tcatagaaaa ttgtatccgt ttcttagaaa atgctcgtaa 300

gctcgag 307

45

<210> 161

<211> 1020

<212> DNA

50

<213> *Lycopersicon esculentum*

5 &lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1)..(1020)

10

&lt;223&gt; Nukleinsäure codierend für ein b-Hydroxylase

15 &lt;400&gt; 161

aagcttccat ggcggccgga atttcagcct ccgctagtgc ccgaaccatt cgcctccgtc 60

ataaccggtt tctcagtcga aaatccgcct caaccgcccc gccggttctg ttctttctctc 120

20 cgttaactcg caattttggc gcaattttgc tgtctagaag aaagccgaga ttggcgggtt 180

gttttgtgct ggagaatgag aaattgaata gtactatcga aagtgagagt gaagtaatag 240

25 aggatcggat acaagtagag attaatgagg agaagagttt agctgccagt tggctggcgg 300

agaaattggc gaggaagaaa tcggagaggt ttacttatct tgtggcagct gtgatgtcta 360

gtttggggat tactttctatg gcgatcttgg cgggtttatta cagattttca tggcaaatgg 420

30 aggggtggaga agtgccctttt tctgaaatgt tagctacatt cactctctcg tttggcgctg 480

ccgtaggaat ggagtactgg gcgagatggg ctcatagagc actatggcat gcttctttat 540

35 ggcacatgca cgagtcgcac catagaccaa gagaaggacc ttttgagatg aacgacgttt 600

tcgccataac aaatgctggt ccagctatag gtctttcttc ctacggtttc ttccataaag 660

ggatcgtccc tggcctctgt ttcggcgctg gattggggat cacagtattt gggatggctt 720

40 acatgttcgt tcacgatgga ctggttcata agagatttcc cgtagggcct attgccaacg 780

tgccttactt tcggagggtg gctgcagcac atcagcttca tcactcggac aaatttgatg 840

45 gtgtcccata tggcttggtt ctaggacctg aggaattgga agaagtagga ggacttgaag 900

agttagaaaa ggaagtcaac cgaaggatta aaatttctaa gggattatta tgatcaaaag 960

atacgtctga taataataaa atgcgattgt atttaggctg tagattatta ttgggaattc 1020

50

&lt;210&gt; 162

&lt;211&gt; 1802

5 &lt;212&gt; DNA

<213> *Petunia hybrida*

10

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Promotor

15 &lt;222&gt; (1) .. (1802)

&lt;223&gt;

20

&lt;400&gt; 162

gagctctagc gcaatccttat gtggtacaaa tcttgattag tcgggaaaaa atgatgtggc 60

25

cctacaaatg gttggaggat gggagatttg gctctatcta gagttatgtg gttgttgaag 120

catttggtta ctctctgctg tggtagttgg catatccaca ttgtctcctt ccacttttat 180

gacaattacg tgaaagttat gggttgtttt gtctatTTTT gtcgaggcct ttcttttcct 240

30

tccaggttgt tgaagatggc ccaattcgat tagaataatg ttttgagctt tagcatattc 300

tctctcgttt acacgattat agtaataatg atataggatg acagaagttg acacataaat 360

35

tttttattct ctccatttac tttaatccaa atctcaccta ccctaaactt ctttaatatg 420

tattcaatag tctatccgag taaattgtaa atttaacaac cattgataat attgacacct 480

actaacatat actagtaaag agaattattaa catggcacat ataatttgat gcaaaatgag 540

40

tatgatgaaa tttaaaccca aaatctcttg attttgacag tgtcaccttg acttgttaac 600

taataagtca tgtttttagtg gcagaaagac aaactcatcc accaactgta tagcaataaa 660

45

aaatagaaga atcttcctga ggcaaagttt tggaaaaatt aagagtggct gagatttaac 720

ttcaacagga attagttcca cttaactttt aggttacgat acagtgctaa ttaaataact 780

taattgtatt agatatttct tgcacctaaa aaatttaaaa actgaaaaaa ggtagcaatc 840

50

aaaataaaca aaaggacaaa ataagtgaag ggtacagcca ccaaccctgg cggctcactg 900



5      tttgttggtt aaaacgtaga cttacaccta ccaaaatcta caactaaaat gaggcaataa      960  
        tactttgccc aaaattacca agaaaagaaa aagaaaggaa tcccttaata ttactctcct      1020  
        ccatttcaca ataaatatcc tagtttgact taaattagag tttaaaaaat gaaagacgac      1080  
        ttttaaaaact tgtaatctaa aataaatcat agttaaatgt gtggctataa atcattgtat      1140  
 10    taacggtaaa gtggtaagtt taaaagttaa ttgttttcaa atataaaatt gtactatcat      1200  
        tcttttttga atggactaat aagaaaacta tgacatccat tatggagcgg agggagtatc      1260  
        tccttttaac aataaccttt gtcccttcaa ttcaattatc agtatgcaa cattaaaaat      1320  
 15    tattattgat gttaagtacc acatcatcct taatgataga atcatcgtag aacgcttttc      1380  
        caggcacaca ttcaaactag ttagaccagt accacacatc gaatattcca gacttctttg      1440  
 20    tttgaatagt cgactacatt ggataatgga acttctcgaa ttaacttcga attagtcgag      1500  
        cccaaaataa tatatacgtc gggtggaata ctataaaatg ttgacaaaa atgtcaaatt      1560  
        aatatatcaa tctgcaacaa ctttttcacc ttgagaacac agctgaaatt ttttaciaag      1620  
 25    gtagttgggtg aagctagtca gcgaatccca ttaccttcca ctctacctaa ccccttcac      1680  
        caacaacaaa tttctgtaat ttaaaaaacta gccaaaaaag aactctcttt taciaagagc      1740  
 30    caaagactca atctttactt tcaagaaaag ctttgcaatt catacagaag tgagaacat      1800  
        gg      1802  
 35    <210> 163  
        <211> 332  
        <212> DNA  
 40    <213> Tagetes erceta  
  
 45    <220>  
        <221> misc\_feature  
        <222> (1)..(332)  
 50

## 233

&lt;223&gt; b-Hydroxylase Sense-Fragment

5 <400> 163  
aagcttgcac gagcctctct ctattttttac acttcaatgg cggcagcaat tgctgtccct 60  
tgtagctcaa gaccatttgg cttagggtcga atgcgggttac ttggtcataa acccacaacc 120  
10 ataacttgctc acttccccctt ttcttttttct atcaaatacat ttaccccaat tgttagggggc 180  
agaagatgta ctgtttggtt tggtgcccgt ggcgacagta atagtaacag taataataat 240  
agtgacagta atagtaataa tccgggtctg gattttaaacc cggcgggttat gaaccgtaac 300  
15 cgtttggttg aagaaaaaat ggagagggtcg ac 332

20 &lt;210&gt; 164

&lt;211&gt; 332

&lt;212&gt; DNA

25 &lt;213&gt; Tagetes erecta

30 &lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1)..(332)

35 &lt;223&gt; b-Hydroxylase Antisense-Fragment

40 <400> 164  
gaattcggca cgagcctctc tctattttta cacttcaatg gcggcagcaa ttgctgtccc 60  
ttgtagctca agaccatttg gcttaggtcg aatgcgggtta cttggtcata aaccacaac 120  
45 cataacttgt cacttccccct ttcttttttc tatcaaataca ttaccccaa ttgtagggg 180  
cagaagatgt actgtttggt ttggtgcccgt tggcgacagt aatagtaaca gtaataataa 240  
tagtgacagt aatagtaata atccgggtct ggattttaaacc ccggcgggtta tgaaccgtaa 300  
50 ccgtttggtt gaagaaaaaa tggagaggat cc 332

<210> 165  
 5 <211> 996  
 <212> DNA  
 10 <213> Künstliche Sequenz  
 <220>  
 15 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(996)  
 20 <223>  
 <400> 165  
 25 ggcacgagcc tctctctatt ttacacttc aatggcggca gcaattgctg tcccttgtag 60  
 ctcaagacca ttggcttag gtgaatgcg gttacttggc cataaacc caaccataac 120  
 ttgtcacttc cccttttctt tttctatcaa atcatttacc ccaattgtta ggggcagaag 180  
 30 atgtactggt tgttttgttg ccggtggcga cagtaatagt aacagtaata ataatagtga 240  
 cagtaatagt aataatccgg gtctggattt aaaccggcg gttatgaacc gtaaccgttt 300  
 35 ggttgaagaa aaaatggaga ggaaaaaatc ggaacgattt acttatcttg ttgcagctat 360  
 tatgtctact ttggaatta cttcaatggc ggttatggcg gtttattacc ggttttcatg 420  
 gcaaattggag ggtggagaaa ttccttatgt ggagatgttt ggtacatttg ctctctccgt 480  
 40 tgggtgctgcg gtaggaatgg agtattgggc aagatgggct catgaggcac tatggcatgc 540  
 ttctttgttg cacatgcatg agtcacacca taagccacga gaaggccgt ttgagcttaa 600  
 tgatgtgttt gctataacaa atgcgggtccc ggccattgcy ttgcttagtt atgggttttt 660  
 45 ccacaaaggc ataattccgg gtctttgttt tggggcggga ctgggaatta cgggtgtttgg 720  
 aatggcgtat atgttcgtcc acgacgggct agttcacaga agattccaag tgggtccgat 780  
 50 tgcgaatgtt ccctatcttc gaagggttgc agcggctcat cagctgcac acacggaaaa 840

atttaaatggt gttccttatg gcttggttctt gggacctaag gagctagaag aagtgggtgg 900  
tacggaagaa ttggacaagg agattcaaag aagaattaaa ttgtataata atactaaata 960  
5 aataaatttt gtataaaaatt aatataattt aatgat 996

<210> 166  
10 <211> 19  
<212> DNA

15 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
20 <221> Primer  
<222> (1) .. (19)

25 <223>

<400> 166  
30 tgccaaagta actcttttat 19

<210> 167  
35 <211> 19  
<212> DNA

40 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
45 <221> Primer  
<222> (1) .. (19)

50 <223>

5 <400> 167  
aggtgcatga ccaagtaac 19

10 <210> 168  
<211> 1033  
<212> DNA  
<213> Arabidopsis thaliana

15 <220>  
<221> Promotor  
20 <222> (1) .. (1033)  
<223> P76

25

30 <400> 168  
aggtgcatga ccaagtaaca atttgattcc tttccagcat aacgtcatgt tggttgcaaa 60  
aagaaggcaa agtagagcaa gcaagcaagc aaagcatttt tcttatttta tattttgttg 120  
cggattccac caccacttg aaaaattgac atgtcacaat gatttcgtat cctagtcttt 180  
tattatttaa cactctcaca atcccattac tctacacctc tttcattaag tcaacacacg 240  
gttttcacaaa atccactacc ctcccaccac ctagaatctt ttgttaccta ccaacaccct 300  
cctttgttct ctttatatat tgggtccaact aaatcaataa gggaaagcat ccttttggtt 360  
40 ggaggaattg ctttcattct cactctttgt gtgttgatca atggactagc taataacaag 420  
ttcctcctct atatatttca aaagaatgga acagaaacat aaacgaaaga cagagtacct 480  
gatgttgatg attcattgtc tgtctggagc tcccaaagtc cttttatgct tacataattca 540  
45 taaccaacaa cggctattaa ttataaacca aaaacacgaa ataagtttgt agcaaagtga 600  
aattaggaat cttggagatg gatccattag tagtaggata ataggatatg atggaatttg 660  
50 gttggggaac agtgataact tacgcttgct tccggcgccg ggaaagttgg aaaacctaca 720

aagtacagaa atggatctgg gccttgaagt gggcttttta ttaaagaaaa aaatacatct 780  
ccgttatcaa tcaccatctt cttctatcta caaattaaag aaggtaacaa cagaacgtgg 840  
5 tggatcatgt ggtaggcat taattatttg ctttgtttcg ccgttttggt aacacacaga 900  
cacagttccg gtaagagctt ttgcagccac tctttatagt tatttagaat tggcgatcga 960  
10 atcaatctca ctccctccct cccttaagtc ttgttgaatc tgctgaattg ttttataaag 1020  
agttactttg gca 1033

15 <210> 169

<211> 18

<212> DNA

20

<213> Künstliche Sequenz

25 <220>

<221> Primer

<222> (1) .. (18)

30

<223>

35 <400> 169

atggaagctc ttctcaag

18

<210> 170

40

<211> 18

<212> DNA

45 <213> Künstliche Sequenz

<220>

50

&lt;221&gt; Primer

&lt;222&gt; (1)..(18)

5 &lt;223&gt;

&lt;400&gt; 170

10 accttaccta aaacattt

18

&lt;210&gt; 171

15 &lt;211&gt; 1666

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lycopersicon esculentum

20

&lt;220&gt;

25 &lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1494)

&lt;223&gt;

30

&lt;400&gt; 171

35 atg gaa gct ctt ctc aag cct ttt cca tct ctt tta ctt tcc tct cct 48  
 Met Glu Ala Leu Leu Lys Pro Phe Pro Ser Leu Leu Leu Ser Ser Pro  
 1 5 10 15

40 aca ccc cat agg tct att ttc caa caa aat ccc tct ttt cta agt ccc 96  
 Thr Pro His Arg Ser Ile Phe Gln Gln Asn Pro Ser Phe Leu Ser Pro  
 20 25 30

45 acc acc aaa aaa aaa tca aga aaa tgt ctt ctt aga aac aaa agt agt 144  
 Thr Thr Lys Lys Lys Ser Arg Lys Cys Leu Leu Arg Asn Lys Ser Ser  
 35 40 45

aaa ctt ttt tgt agc ttt ctt gat tta gca ccc aca tca aag cca gag 192  
 Lys Leu Phe Cys Ser Phe Leu Asp Leu Ala Pro Thr Ser Lys Pro Glu  
 50 55 60

50 tct tta gat gtt aac atc tca tgg gtt gat cct aat tcg aat cgg gct 240

## 239

	Ser	Leu	Asp	Val	Asn	Ile	Ser	Trp	Val	Asp	Pro	Asn	Ser	Asn	Arg	Ala	
	65					70					75					80	
5	caa	ttc	gac	gtg	atc	att	atc	gga	gct	ggc	cct	gct	ggg	ctc	agg	cta	288
	Gln	Phe	Asp	Val	Ile	Ile	Ile	Gly	Ala	Gly	Pro	Ala	Gly	Leu	Arg	Leu	
					85					90					95		
10	gct	gaa	caa	gtt	tct	aaa	tat	ggt	att	aag	gta	tgt	tgt	gtt	gac	cct	336
	Ala	Glu	Gln	Val	Ser	Lys	Tyr	Gly	Ile	Lys	Val	Cys	Cys	Val	Asp	Pro	
				100				105						110			
15	tca	cca	ctc	tcc	atg	tgg	cca	aat	aat	tat	ggt	gtt	tgg	gtt	gat	gag	384
	Ser	Pro	Leu	Ser	Met	Trp	Pro	Asn	Asn	Tyr	Gly	Val	Trp	Val	Asp	Glu	
				115				120					125				
20	ttt	gag	aat	tta	gga	ctg	gaa	aat	tgt	tta	gat	cat	aaa	tgg	cct	atg	432
	Phe	Glu	Asn	Leu	Gly	Leu	Glu	Asn	Cys	Leu	Asp	His	Lys	Trp	Pro	Met	
		130				135					140						
25	act	tgt	gtg	cat	ata	aat	gat	aac	aaa	act	aag	tat	ttg	gga	aga	cca	480
	Thr	Cys	Val	His	Ile	Asn	Asp	Asn	Lys	Thr	Lys	Tyr	Leu	Gly	Arg	Pro	
		145				150				155					160		
30	tat	ggt	aga	gtt	agt	aga	aag	aag	ctg	aag	ttg	aaa	ttg	ttg	aat	agt	528
	Tyr	Gly	Arg	Val	Ser	Arg	Lys	Lys	Leu	Lys	Leu	Lys	Leu	Leu	Asn	Ser	
				165				170					175				
35	tgt	gtt	gag	aac	aga	gtg	aag	ttt	tat	aaa	gct	aag	gtt	tgg	aaa	gtg	576
	Cys	Val	Glu	Asn	Arg	Val	Lys	Phe	Tyr	Lys	Ala	Lys	Val	Trp	Lys	Val	
			180				185					190					
40	gaa	cat	gaa	gaa	ttt	gag	tct	tca	att	gtt	tgt	gat	gat	ggg	aag	aag	624
	Glu	His	Glu	Glu	Phe	Glu	Ser	Ser	Ile	Val	Cys	Asp	Asp	Gly	Lys	Lys	
			195				200					205					
45	ata	aga	ggt	agt	ttg	gtt	gtg	gat	gca	agt	ggt	ttt	gct	agt	gat	ttt	672
	Ile	Arg	Gly	Ser	Leu	Val	Val	Asp	Ala	Ser	Gly	Phe	Ala	Ser	Asp	Phe	
		210				215					220						
50	ata	gag	tat	gac	agg	cca	aga	aac	cat	ggt	tat	caa	att	gct	cat	ggg	720
	Ile	Glu	Tyr	Asp	Arg	Pro	Arg	Asn	His	Gly	Tyr	Gln	Ile	Ala	His	Gly	
		225				230				235				240			
55	gtt	tta	gta	gaa	gtt	gat	aat	cat	cca	ttt	gat	ttg	gat	aaa	atg	gtg	768
	Val	Leu	Val	Glu	Val	Asp	Asn	His	Pro	Phe	Asp	Leu	Asp	Lys	Met	Val	
			245				250					255					
60	ctt	atg	gat	tgg	agg	gat	tct	cat	ttg	ggt	aat	gag	cca	tat	tta	agg	816
	Leu	Met	Asp	Trp	Arg	Asp	Ser	His	Leu	Gly	Asn	Glu	Pro	Tyr	Leu	Arg	
		260					265					270					



## 240

5	gtg aat aat gct aaa gaa cca aca ttc ttg tat gca atg cca ttt gat	864
	Val Asn Asn Ala Lys Glu Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro Phe Asp	
	275 280 285	
	aga gat ttg gtt ttc ttg gaa gag act tct ttg gtg agt cgt cct gtt	912
	Arg Asp Leu Val Phe Leu Glu Glu Thr Ser Leu Val Ser Arg Pro Val	
10	290 295 300	
	tta tcg tat atg gaa gta aaa aga agg atg gtg gca aga tta agg cat	960
	Leu Ser Tyr Met Glu Val Lys Arg Arg Met Val Ala Arg Leu Arg His	
	305 310 315 320	
	ttg ggg atc aaa gtg aaa agt gtt att gag gaa gag aaa tgt gtg atc	1008
15	Leu Gly Ile Lys Val Lys Ser Val Ile Glu Glu Glu Lys Cys Val Ile	
	325 330 335	
	cct atg gga gga cca ctt ccg cgg att cct caa aat gtt atg gct att	1056
	Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Arg Ile Pro Gln Asn Val Met Ala Ile	
	340 345 350	
20	ggg ggg aat tca ggg ata gtt cat cca tca aca ggg tac atg gtg gct	1104
	Gly Gly Asn Ser Gly Ile Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met Val Ala	
	355 360 365	
	agg agc atg gct tta gca cca gta cta gct gaa gcc atc gtc gag ggg	1152
	Arg Ser Met Ala Leu Ala Pro Val Leu Ala Glu Ala Ile Val Glu Gly	
25	370 375 380	
	ctt ggc tca aca aga atg ata aga ggg tct caa ctt tac cat aga gtt	1200
	Leu Gly Ser Thr Arg Met Ile Arg Gly Ser Gln Leu Tyr His Arg Val	
	385 390 395 400	
	tgg aat ggt ttg tgg cct ttg gat aga aga tgt gtt aga gaa tgt tat	1248
30	Trp Asn Gly Leu Trp Pro Leu Asp Arg Arg Cys Val Arg Glu Cys Tyr	
	405 410 415	
	tca ttt ggg atg gag aca ttg ttg aag ctt gat ttg aaa ggg act agg	1296
	Ser Phe Gly Met Glu Thr Leu Leu Lys Leu Asp Leu Lys Gly Thr Arg	
	420 425 430	
35	aga ttg ttt gac gct ttc ttt gat ctt gat cct aaa tac tgg caa ggg	1344
	Arg Leu Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Asp Pro Lys Tyr Trp Gln Gly	
	435 440 445	
	ttc ctt tct tca aga ttg tct gtc aaa gaa ctt ggt tta ctc agc ttg	1392
	Phe Leu Ser Ser Arg Leu Ser Val Lys Glu Leu Gly Leu Leu Ser Leu	
40	450 455 460	
	tgt ctt ttc gga cat ggc tca aac atg act agg ttg gat att gtt aca	1440

241

Cys Leu Phe Gly His Gly Ser Asn Met Thr Arg Leu Asp Ile Val Thr  
 465 470 475 480

5 aaa tgt cct ctt cct ttg gtt aga ctg att ggc aat cta gca ata gag 1488  
 Lys Cys Pro Leu Pro Leu Val Arg Leu Ile Gly Asn Leu Ala Ile Glu  
 485 490 495

10 agc ctt tgaatgtgaa aagtttgaat cattttcttc attttaattt ctttgattat 1544  
 Ser Leu

tttcatatatt tctcaattgc aaaagtgaga taagagctac atactgtcaa caaataaact 1604

15 actattggaa agttaaaata tgtgtttgtt gtatgttatt ctaatggaat ggattttgta 1664

aa 1666

20 <210> 172

<211> 498

<212> PRT

25 <213> Lycopersicon esculentum

30 <400> 172

Met Glu Ala Leu Leu Lys Pro Phe Pro Ser Leu Leu Leu Ser Ser Pro  
 1 5 10 15

35 Thr Pro His Arg Ser Ile Phe Gln Gln Asn Pro Ser Phe Leu Ser Pro  
 20 25 30

40 Thr Thr Lys Lys Lys Ser Arg Lys Cys Leu Leu Arg Asn Lys Ser Ser  
 35 40 45

45 Lys Leu Phe Cys Ser Phe Leu Asp Leu Ala Pro Thr Ser Lys Pro Glu  
 50 55 60

Ser Leu Asp Val Asn Ile Ser Trp Val Asp Pro Asn Ser Asn Arg Ala  
 65 70 75 80

50

## 242

Gln Phe Asp Val Ile Ile Ile Gly Ala Gly Pro Ala Gly Leu Arg Leu  
                     85                    90                    95

5 Ala Glu Gln Val Ser Lys Tyr Gly Ile Lys Val Cys Cys Val Asp Pro  
                     100                    105                    110

10 Ser Pro Leu Ser Met Trp Pro Asn Asn Tyr Gly Val Trp Val Asp Glu  
                     115                    120                    125

15 Phe Glu Asn Leu Gly Leu Glu Asn Cys Leu Asp His Lys Trp Pro Met  
                     130                    135                    140

20 Thr Cys Val His Ile Asn Asp Asn Lys Thr Lys Tyr Leu Gly Arg Pro  
                     145                    150                    155                    160

Tyr Gly Arg Val Ser Arg Lys Lys Leu Lys Leu Lys Leu Leu Asn Ser  
                     165                    170                    175

25 Cys Val Glu Asn Arg Val Lys Phe Tyr Lys Ala Lys Val Trp Lys Val  
                     180                    185                    190

30 Glu His Glu Glu Phe Glu Ser Ser Ile Val Cys Asp Asp Gly Lys Lys  
                     195                    200                    205

35 Ile Arg Gly Ser Leu Val Val Asp Ala Ser Gly Phe Ala Ser Asp Phe  
                     210                    215                    220

Ile Glu Tyr Asp Arg Pro Arg Asn His Gly Tyr Gln Ile Ala His Gly  
                     225                    230                    235                    240

40 Val Leu Val Glu Val Asp Asn His Pro Phe Asp Leu Asp Lys Met Val  
                     245                    250                    255

45 Leu Met Asp Trp Arg Asp Ser His Leu Gly Asn Glu Pro Tyr Leu Arg  
                     260                    265                    270

50 Val Asn Asn Ala Lys Glu Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro Phe Asp  
                     275                    280                    285

5 Arg Asp Leu Val Phe Leu Glu Glu Thr Ser Leu Val Ser Arg Pro Val  
 290 295 300

10 Leu Ser Tyr Met Glu Val Lys Arg Arg Met Val Ala Arg Leu Arg His  
 305 310 315 320

15 Leu Gly Ile Lys Val Lys Ser Val Ile Glu Glu Glu Lys Cys Val Ile  
 325 330 335

20 Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Arg Ile Pro Gln Asn Val Met Ala Ile  
 340 345 350

25 Gly Gly Asn Ser Gly Ile Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met Val Ala  
 355 360 365

30 Arg Ser Met Ala Leu Ala Pro Val Leu Ala Glu Ala Ile Val Glu Gly  
 370 375 380

35 Leu Gly Ser Thr Arg Met Ile Arg Gly Ser Gln Leu Tyr His Arg Val  
 385 390 395 400

40 Trp Asn Gly Leu Trp Pro Leu Asp Arg Arg Cys Val Arg Glu Cys Tyr  
 405 410 415

45 Ser Phe Gly Met Glu Thr Leu Leu Lys Leu Asp Leu Lys Gly Thr Arg  
 420 425 430

50 Arg Leu Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Asp Pro Lys Tyr Trp Gln Gly  
 435 440 445

Phe Leu Ser Ser Arg Leu Ser Val Lys Glu Leu Gly Leu Leu Ser Leu  
 450 455 460

Cys Leu Phe Gly His Gly Ser Asn Met Thr Arg Leu Asp Ile Val Thr  
 465 470 475 480

PF 53862

244

Lys Cys Pro Leu Pro Leu Val Arg Leu Ile Gly Asn Leu Ala Ile Glu  
485 490 495

5 Ser Leu

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**